

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO EXPERIMENTAL DEL
TROFISMO INTESTINAL TRAS COLECTOMÍA.
ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DE LA NEUROTENSINA.**

DIRECTORES DE TESIS

Prof. Dr. HIPÓLITO DURÁN SACRISTÁN

Dr. ENRIQUE DE MIGUEL DEL CAMPO

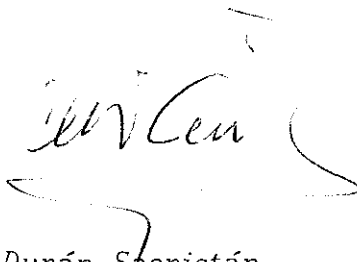
ALBERTO MATA JUBERÍAS

1992

DON HIPÓLITO DURÁN SACRISTÁN, CATEDRÁTICO DE PATOLOGÍA Y CLÍNICA QUIRÚRGICA Y PROFESOR EMÉRITO DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.

CERTIFICA: Que el trabajo de investigación "ESTUDIO EXPERIMENTAL DEL TROFISMO INTESTINAL TRAS COLECTOMIA. ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DE LA NEUROTENSINA", realizado por Don Alberto Mata Juberías, para optar al grado de Doctor, ha sido realizado bajo mi dirección y supervisión, otorgando mi conformidad para ser presentado como Tesis Doctoral ante el Tribunal que en su día se designe.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, extiendo la siguiente certificación en Madrid, a diez y ocho de Septiembre de mil novecientos noventa y dos.

A handwritten signature in dark ink, appearing to read 'Hipólito Durán Sacristán', with a long, sweeping flourish extending to the right.

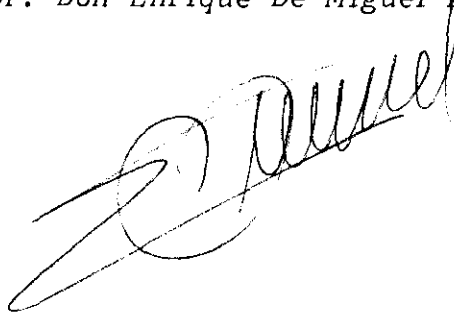
Firmado: Profesor Durán Sacristán

*DON ENRIQUE DE MIGUEL DEL CAMPO, DOCTOR EN MEDICINA POR LA
FACULTAD DE MEDICINA. UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.*

*CERTIFICA: Que el trabajo de investigación "ESTUDIO EXPERIMENTAL
DEL TROFISMO INTESTINAL TRAS COLECTOMIA. ANALISIS DE LA
INFLUENCIA DE LA NEUROTENSINA", realizado por Don Alberto Mata
Juberías, para optar al grado de Doctor, ha sido realizado bajo mi
dirección y supervisión durante los años 1990, 1991 y 1992, habiendo el
que suscribe revisado el presente trabajo, estando conforme para su
presentación para ser juzgado ante el Tribunal como Tesis Doctoral que
en su día se designe.*

*Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes,
extiendo la siguiente certificación en Madrid, a once de Septiembre de
mil novecientos noventa y dos.*

Firmado: Dr. Don Enrique De Miguel Del Campo

A handwritten signature in dark ink, appearing to read 'Enrique De Miguel Del Campo', written over a faint circular stamp or seal.

ÍNDICE

ESTUDIO EXPERIMENTAL DEL TROFISMO INTESTINAL TRAS COLECTOMÍA.

ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DE LA NEUROTENSINA.

AGRADECIMIENTOS	2
1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	3
2. INTRODUCCIÓN	9
FACTORES REGULADORES DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR	16
A) FACTORES NUTRICIONALES	17
B) FACTORES ENDOCRINOS	19
HORMONAS NO GASTROINTESTINALES	19
HORMONAS GASTROINTESTINALES	20
SECRETINA	21
GASTRINA	22
COLECISTOQUININA	22
SOMATOSTATINA	22
POLIPÉPTIDO INHIBIDOR GÁSTRICO	23
BOMBESINA	23
POLIPÉPTIDO YY	23
POLIPÉPTIDO PANCREÁTICO	23
FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO	24

MOTILINA	24
NEUROPEPTIDOS	24
ENTEROGLUCAGÓN	26
NEUROTENSINA	28
C) FACTORES MUCOSOS	31
D) FACTORES NEUROVASCULARES	32
E) FACTORES QUIRÚRGICOS	33
F) OTROS FACTORES	35
PROSTAGLANDINAS	35
POLIAMINAS	36
FUNCIÓN DEL COLON EN LA REGULACIÓN DE LA ADAPTACIÓN A LA RESECCIÓN	38
3. MATERIAL Y MÉTODOS	41
 MATERIAL	42
 EN FASES I y II	
ANIMALES	42
INSTRUMENTAL QUIRÚRGICO	42
MATERIAL FUNGIBLE	43
SUEROS Y FÁRMACOS	43
APARATOS	44
 EN FASE III	
PROLIFERACIÓN CELULAR	44

NIVELES HORMONALES	46
MARCAJE DEL GLUCAGÓN	46
PURIFICACIÓN DEL ¹²⁵ I-GLUCAGÓN	46
TRATAMIENTO DEL PLASMA	46
SISTEMA RADIOINMUNOLÓGICO	47
MÉTODOS	48
ANIMALES	48
GRUPOS	49
FASES DEL ESTUDIO	49
FASE I	50
PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO	50
TRATAMIENTO POSTOPERATORIO	50
FASE II	51
PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO	51
EXTRACCIÓN DE LA PRIMERA MUESTRA DE SANGRE	51
SOBRECARGA DE GLUCOSA	52
EXTRACCIÓN DE LA SEGUNDA MUESTRA DE SANGRE	52
OBTENCIÓN DE MUESTRAS DEL INTESTINO	52
FASE III	54
PROLIFERACIÓN CELULAR	54
NIVELES HORMONALES	57
DETERMINACIÓN DEL GLUCAGÓN	57
PREPARACIÓN DEL GLUCAGÓN RADIOACTIVO	58
PURIFICACIÓN DEL ¹²⁵ I-GLUCAGÓN	58
TRATAMIENTO DEL PLASMA	59

SEPARACION POR CARBÓN-DEXTRANO	60
SISTEMA RADIOINMUNOLÓGICO	60
CÁLCULO DE RESULTADOS	61
SENSIBILIDAD DEL RIA	62
VALORACIÓN DEL GLUCAGÓN	62
VALORACIÓN DE LOS GLI	63
ESTUDIO ESTADÍSTICO	63
 4. RESULTADOS	64
 MORTALIDAD	65
PÉRDIDA DE PESO	66
PROLIFERACIÓN CELULAR	68
ÍNDICE DE MITOSIS. PCNA	68
ÍNDICE DE MITOSIS. HEMATOXILINA-EOSINA	71
GLUCAGÓN, GLI Y ENTEROGLUCAGÓN	74
ESTUDIO ESTADÍSTICO	77
 5. DISCUSION	81
 6. CONCLUSIONES	103
 7. RESUMEN	105
 8. BIBLIOGRAFIA	107

AGRADECIMIENTOS

Al Prof. D. Hipólito Durán Sacristán, por haber tenido la amabilidad de aceptar la dirección de este trabajo.

Al Dr. Enrique de Miguel del Campo, que me ofreció su amistad y apoyo en este proyecto, por su permanente disponibilidad y constante empuje.

Al Dr. Ignacio Álvarez Gómez de Segura, por las horas que dedicó a enseñarme el manejo delicado de los animales y la mayor parte de las técnicas empleadas en este trabajo. Sin él no habría sido posible realizarlo.

Al Prof. Luis Santamaría, del Departamento de Morfología de la U.A.M. y a su técnico de laboratorio, Carmen, por sus enseñanzas y ayuda imprescindible en el estudio de la proliferación celular.

A la Dra. Isabel Valverde y a su equipo del Departamento de Endocrinología de la Fundación Jiménez Díaz, por su ayuda en la determinación de los niveles plasmáticos de glucagón.

A mis compañeros y amigos del Servicio de Cirugía del Dr. Barreiro del Hospital La Paz, por su paciencia conmigo. Especialmente a mi amigo el Dr. Joaquín Díaz por su aliento y consejos hasta la finalización de este trabajo.

A las enfermeras, auxiliares, secretaria y celadores del Servicio de Cirugía Experimental del Hospital La Paz, por su colaboración.

A Sonia y Carlota, por su alegre ayuda diaria.

A Pablo Torres, por su colaboración en el manejo de los medios técnicos.

A mi familia, especialmente Javier y Maite, por su apoyo y ayuda en la preparación del manuscrito.

A Carmen, por sus valiosos comentarios en la revisión del texto.

1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.

La resección intestinal es una técnica habitual en cirugía que en la mayoría de los casos no genera consecuencias graves en el postoperatorio. La gravedad de las alteraciones que siguen a una enterectomía depende fundamentalmente de la longitud del segmento resecado. Algunas enfermedades –tales como malformaciones, enteritis de Crohn, colitis ulcerosa, enteritis por radiación, isquemia mesentérica con infarto intestinal masivo, algunos tumores y determinados procesos como la obstrucción intestinal crónica y complicaciones fistulosas postquirúrgicas– obligan, no obstante, a practicar resecciones amplias que tienen como resultado un conjunto de síntomas y trastornos metabólicos conocidos con el nombre de "Síndrome de intestino corto".

La respuesta a la resección no es de la misma intensidad en todos los casos y, por otra parte, con el paso del tiempo se amortiguan los efectos de este síndrome. La diarrea que aparece después de una amplia exéresis intestinal mejora paulatinamente, lo que refleja el desarrollo de una adaptación en el intestino restante para disminuir el defecto de absorción. Esta respuesta de adaptación es morfológica y se puede comprobar el aumento del diámetro y la elongación del intestino, así como el aumento de la longitud de sus vellosidades, todo ello dirigido a incrementar la superficie mucosa capaz de absorber nutrientes.

Cuando la resección intestinal es masiva, el proceso de adaptación no es suficiente para permitir el aporte de nutrientes al organismo y el paciente está condenado a una nutrición parenteral prolongada que plantea múltiples problemas –mecánicos, metabólicos

y sépticos– que condicionan su supervivencia. Si bien están descritos casos de nutrición parenteral total de más de ocho años de duración con reincorporación a la vida laboral, es obvio que esta situación no puede considerarse definitiva sino sólo paliativa.

El trasplante intestinal podría ser la solución ideal, cuando se superen los graves problemas del rechazo, pero aun así quedarían otros por resolver. La atrofia de la mucosa tras el implante es habitual y hace fracasar muchas de las operaciones de trasplante.

El gran número de intervenciones de resección que se practica obliga a que se continúe la investigación; los estudios se han orientado a determinar cuáles son los factores que intervienen en la regulación de la respuesta de adaptación, y, así, tratar de estimularla. Si se consiguiese potenciar esta respuesta no sería preciso prolongar tanto la nutrición parenteral, en los casos de intestino corto, y, al evitarse la atrofia de la mucosa, los trasplantes intestinales podrían tener más éxito.

Investigaciones recientes han demostrado que el intestino posee péptidos con diferentes acciones. Además, en la pared del intestino han sido descubiertas células productoras de hormonas específicas intestinales. En la actualidad se considera al intestino como uno de los mayores órganos endocrinos del organismo, pero todavía no se conocen con exactitud la mayoría de los péptidos en él existentes, ni sus acciones. Las aportaciones científicas encaminadas a la comprensión de estos péptidos y sus mecanismos de regulación han sido numerosas, sin embargo no se han obtenido aún conclusiones que puedan ser consideradas definitivas.

El descubrimiento, por Gleeson y Bloom, de un tumor renal causante de hiperplasia en la mucosa intestinal y de alteraciones de la motilidad y de la absorción, con niveles

plasmáticos elevados de enteroglucagón, orientó los estudios hacia el papel trófico de esta hormona sobre el intestino.

En las publicaciones posteriores a este hallazgo, el enteroglucagón ha sido ya reconocido como una auténtica hormona trófica intestinal. La extirpación del intestino delgado eleva los niveles plasmáticos de enteroglucagón en correlación con la hiperplasia que aparece en el segmento restante. La mayoría de los autores admiten que el enteroglucagón es el responsable de los cambios tróficos.

Las células productoras de enteroglucagón se distribuyen por todo el tubo digestivo, pero su mayor concentración se da en íleon terminal y colon. El enteroglucagón no ha sido sintetizado aún y, por tanto, no es posible su administración (medio por el que podríamos obtener evidencia directa de sus acciones).

La neurotensina es una hormona hipotalámica, que también ha sido aislada en células de la mucosa del intestino delgado. Su participación en la fisiología del aparato digestivo es amplia: sus niveles plasmáticos se elevan a los treinta minutos de la ingesta, hace aumentar la permeabilidad capilar intestinal y estimula la motilidad y la defecación.

Actualmente los investigadores la consideran posible hormona trófica intestinal, al reconocerse entre sus múltiples acciones la de estimular la liberación de enteroglucagón. Neurotensina y enteroglucagón están, así pues, en lo que respecta al trofismo intestinal, relacionados.

La neurotensina ha sido sintetizada en laboratorio; su administración es, por tanto, posible (lo que nos proporcionará evidencia directa de sus acciones).

De este modo, la posible influencia, directa o mediada por la liberación de enteroglucagón, de la neurotensina en el trofismo de la mucosa tras resección intestinal

merece ser estudiada y más por cuanto podría tener interesantes consecuencias para la clínica humana dada la facilidad de su administración.

Numerosos investigadores se han ocupado del trofismo tras resección de intestino delgado y algunos han estudiado el papel que el colon desempeña en su regulación, pero no conocemos trabajos recientes que se interesen por el influjo de la resección cólica masiva sobre los mecanismos de adaptación. La presencia de una gran cantidad de células productoras de enteroglucagón en el colon hace necesario este estudio.

Asimismo, el desconocimiento existente sobre la respuesta de adaptación del intestino delgado y del colon restante a la pérdida de la mayor parte del colon y el afán por intentar descubrir si los cambios son susceptibles de modificación por la acción de la neurotensina, aumentan nuestro interés en este trabajo.

Son éstos, en conjunto, los motivos que nos han conducido a la realización de este estudio experimental, con él perseguimos los objetivos que señalamos a continuación.

OBJETIVOS

Con este trabajo pretendemos conocer y valorar:

- 1º.- La respuesta adaptativa en el intestino delgado tras la resección del setenta y cinco por cien del colon –derecho y transversal.
- 2º.- La respuesta en el veinticinco por cien de colon restante.
- 3º.- La relación entre esta respuesta y los niveles plasmáticos de enteroglucagón.
- 4º.- Los efectos entero-tróficos derivados de la administración de neurotensina.
- 5º.- La relación entre la administración de neurotensina y los niveles plasmáticos de enteroglucagón.

2. INTRODUCCIÓN.

El cirujano se enfrenta en muchas ocasiones con la necesidad de realizar una gran resección intestinal. La colitis ulcerosa, la enfermedad de Crohn, la isquemia mesentérica, la enteritis por radiación y algunos tumores pueden exigir una extirpación de intestino de tal magnitud que el segmento restante no permita mantener una alimentación oral normal dada la pérdida incontrolada de líquidos y electrolitos, al estar alteradas las funciones intestinales de digestión y absorción, que son esenciales. En tales casos los pacientes sufren lo que se conoce como **síndrome de intestino corto**.

No se puede precisar cuál es la longitud mínima de intestino restante que permita prevenir los graves trastornos metabólicos de este síndrome, pero, en general, se considera que aparecen a partir de la resección de un setenta y cinco por cien de intestino delgado. Las consecuencias de una extirpación amplia se agravarán en el caso de que se reseque el intestino delgado y el grueso.

Aunque la sintomatología de este síndrome es constante, sus manifestaciones no son homogéneas y pueden incluso revertir parcialmente con el paso del tiempo. Existe, pues, la posibilidad de una **adaptación intestinal** a la resección. Los estudios de Dowling y Booth lo demostraron al probar el aumento de la capacidad de absorción de glucosa en el intestino restante tras resección amplia (1).

No obstante, a pesar de que la respuesta de adaptación de la mucosa intestinal se produzca, esto no es suficiente para mantener las funciones digestivas del intestino y se hace preciso que los pacientes sean alimentados por vía intravenosa –en ocasiones la única posibilidad de nutrición (2).

Así pues, el síndrome de intestino corto no es incompatible con la vida, pero los enfermos que lo padecen plantean numerosos problemas –técnicos, sépticos y metabólicos– derivados no sólo de la nutrición parenteral, que puede mantenerse durante años, sino también de la pérdida de las funciones no absorptivas del intestino: las endocrinas e inmunológicas.

El intestino es reconocido actualmente como un órgano con destacadas funciones endocrinas e inmunológicas entre las que resaltamos la actuación de la mucosa como barrera protectora que aísla la flora bacteriana de la circulación sistémica. A pesar de la nutrición parenteral estas funciones no se mantienen puesto que la ausencia de nutrientes produce cambios degenerativos en la mucosa; cambios cuya máxima expresión es la atrofia de vellosidades y la pérdida de integridad de la capa mucosa. Al romperse esta barrera, las bacterias enterales consiguen pasar al torrente circulatorio, la denominada translocación bacteriana que está considerada el primer paso que conduce al síndrome de fracaso multi-orgánico (3).

La nutrición parenteral no es la solución definitiva a la falta de intestino; sólo podría serlo el trasplante intestinal. Pero los resultados de esta técnica no son aún alentadores y, a pesar de los avances en el tratamiento contra el rechazo del injerto, la atrofia de la mucosa continúa siendo un grave problema que hace fracasar esta vía en muchas ocasiones.

Por todos estos y otros motivos el tracto digestivo es objeto constante de investigación y la búsqueda de una solución definitiva para el síndrome de intestino corto

nos obliga a continuar el estudio de la **adaptación intestinal** a la resección y el de sus **mecanismos reguladores**.

Pero para comprender plenamente este fenómeno debemos recordar primero cómo es la estructura y el funcionamiento del órgano encargado de llevarlo a cabo.

MORFOLOGÍA

La estructura mucosa intestinal es de la mayor importancia para el mantenimiento de su fisiología. La superficie de absorción aumenta gracias a las válvulas conniventes, que la triplican, y a las vellosidades, capaces de aumentar su longitud hasta veinte veces. Además, las células epiteliales columnares que cubren las vellosidades tienen un borde en cepillo que es un sistema de microvellosidades con posibilidad de multiplicar la superficie de absorción hasta cuarenta veces.

Las microvellosidades están cubiertas por una membrana de tres capas: la interna y la externa son de proteínas y la central es de lípidos. En la luz de esta estructura trilaminar hay una fina capa de glicoproteínas que contiene los sistemas enzimáticos, como las disacaridasas y dipeptidasas.

En la base de la vellosidad se ven habitualmente tres fosas glandulares –criptas de Lieberkühn– cuya capa de epitelio columnar continúa la de la vellosidad, con interrupciones de células caliciformes productoras de moco. Es en las criptas donde tiene lugar la división celular. Las células epiteliales columnares, que fueron denominadas por Booth "enterocitos" (4), nacen en la base de la cripta, van madurando hacia la punta de la vellosidad y caen

a la luz intestinal. Los enterocitos forman uno de los tejidos del organismo de renovación más veloz, sólo superada por algún tumor de crecimiento rápido.

El ciclo celular dura de diez a diecisiete horas en los roedores y al menos veinticuatro en el hombre. La fase M, de auténtica mitosis, ocupa una mínima parte de todo el ciclo, aproximadamente una hora. La fase S, de síntesis de DNA, dura de seis a once horas. La síntesis de RNA y proteínas tiene lugar durante la fase S y durante las fases premitótica $-G_2-$ y postmitótica $-G_1$. El epitelio intestinal se renueva por completo de dos a tres días en la rata y de tres a cinco días en el hombre. En el colon, la proliferación sigue un patrón similar al del intestino delgado, pero el recambio es algo más lento. En el hombre dura de cuatro a ocho días (5).

En la base de la cripta, además de los enterocitos y de las células caliciformes, existen células de Paneth, que podrían servir de nutrientes para las células epiteliales vecinas, y las células argentafines, endocrinas, que contienen gránulos de serotonina y de otros péptidos.

En la mucosa del colon no hay válvulas conniventes, ni vellosidades (desaparecen al final de la vida fetal) y el epitelio es columnar simple, con numerosas células secretoras de moco. Las válvulas conniventes del intestino delgado están aquí sustituidas por pliegues semicirculares, que incluyen mucosa, submucosa y la capa interna de la muscularis. El epitelio está preparado para la absorción de agua.

Hay, además, un aspecto de la morfología de las vellosidades que debe ser tenido en cuenta: la forma externa de las vellosidades intestinales no es una constante sino que

varía en correlación con cambios geográficos. En Europa son digitiformes y en Asia, África Central y Sudamérica presentan forma de hoja. Cuando se traslada un individuo de una zona a otra del planeta cambia la apariencia de las vellosidades, pero este cambio revierte al regresar al punto de origen (6). Este hecho demuestra que la estructura de las vellosidades de la mucosa intestinal es susceptible de adaptación.

FISIOLOGÍA

El intestino delgado cumple las funciones de absorción, secreción de agua y electrolitos, motilidad y digestión. Esta digestión tiene lugar en dos fases –intraluminal y mucosa o enzimática.

Los carbohidratos aportan la mayor cantidad de calorías al organismo (la ingesta occidental de carbohidratos suele ser de unos 400 g/d), más de la mitad en forma de almidón (60%) y el resto en forma de sucrosa (30%) y lactosa (10%). La digestión luminal en la que participan la amilasa salivar y pancreática origina moléculas de dos glucosas (maltosa) o tres (maltotriosa) y oligosacáridos que no pueden absorberse todavía. La digestión mucosa se produce en la membrana del enterocito; el borde en cepillo de su membrana apical posee enzimas especializadas en convertir los oligosacáridos que le llegan en monosacáridos ya absorbibles. A pesar de la eficacia de este proceso, de un dos a un veinte por cien de almidón llega al colon sin digerirse, procedente de la fibra –se calcula que llegan diariamente hasta setenta gramos al colon humano– y allí es fermentado por las bacterias en ácidos grasos volátiles, hidrógeno y metano. El hidrógeno y el metano contribuyen al gas intestinal, pero los ácidos grasos volátiles se absorben en las células epiteliales del colon y son su principal fuente de energía.

Las grasas pueden llegar a aportar hasta un cincuenta por cien del contenido calórico en una dieta occidental. Su proceso de digestión es eficaz –se absorbe hasta un noventa y cinco por cien de lo que se ingiere, unos 160 g/d. La mayor parte se absorbe en el yeyuno proximal. Para llevar a cabo esta digestión son esenciales las sales biliares y la integridad de la anatomía de la región ileocecal, que permiten la circulación entero–hepática. Las sales biliares recorren este circuito de cuatro a doce veces al día, perdiéndose por las heces sólo un dos por cien de su cantidad total. Las que llegan al colon no se absorben, pero estimulan la motilidad, la secreción de cloruro sódico y aumentan la permeabilidad de la mucosa a los iones y el agua. El exceso de sales biliares en el colon por pérdida de la integridad ileocecal puede producir una diarrea acuosa.

En la dieta occidental, la ingesta de proteínas es de 70–100 gramos diarios. Su digestión proporciona sólo un diez por cien de las calorías totales.

El exceso de algún nutriente en la dieta o la pérdida de parte del intestino obliga a que algunos de los procesos de digestión y absorción se trasladen a otros segmentos intestinales, que sufren una adaptación para suplir la función no realizada. Por ejemplo, el exceso de lípidos hace que aumente la absorción ileal que en condiciones normales es mínima.

La capacidad de regeneración del epitelio intestinal es la propiedad que permite el normal desarrollo de las funciones intestinales y la adaptación a nuevos estados. La replicación, migración y diferenciación son características innatas del epitelio intestinal, que

podrían estar condicionadas genéticamente (7) y reguladas por mecanismos homeostáticos sensibles y complejos (8).

Son numerosos los factores que intervienen en los mecanismos de regulación de la proliferación celular y muchas las situaciones en las que se ven alterados para modificar la respuesta trófica de adaptación del intestino a ellas. Debemos revisar, pues, los factores que modifican la proliferación celular en diferentes situaciones.

FACTORES REGULADORES DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

A) Nutricionales:

Modificaciones en la ingesta y su efecto sobre las secreciones endógenas.

B) Endocrinos:

Tiroideos, hipofisarios, adrenales y las hormonas tróficas.

C) Mucosos:

Lesión mucosa por factores físicos, químicos, inflamatorios o dietéticos.

D) Neurovasculares:

Flujo sanguíneo, innervación autonómica y neurotransmisores.

E) Quirúrgicos:

Resección intestinal, transposición yeyunal, bypass, derivación biliopancreática o la transección intestinal.

F) Otros factores:

Fundamentalmente las poliaminas y prostaglandinas.

A) FACTORES NUTRICIONALES

El ayuno es capaz de causar una atrofia intestinal importante tanto en el animal de experimentación como en el hombre. Esta atrofia no sólo interesa a la mucosa sino que puede afectar incluso a la muscular (9). Se ha observado que tras cuatro días de ayuno se prolonga el ciclo celular (10) y disminuye la producción celular en la cripta (11).

La hipoplasia causada por el ayuno revierte completamente con la alimentación (12). Con la reducción de las proteínas en la dieta se observan los mismos cambios (13).

Por el contrario, la hiperfagia inducida por hipotermia o cirugía ocasiona hiperplasia de la mucosa (14).

La nutrición parenteral produce también hipoplasia, mayor en el yeyuno que en el íleon. Esta hipoplasia, como la del ayuno, revierte también con la administración luminal de nutrientes; asimismo, éstos previenen la aparición de hipoplasia. Este efecto podría estar mediado por péptidos mitogénicos (15).

Para Dowling (16) los enterocitos podrían nutrirse directamente, a expensas de los nutrientes que atraviesan la célula, antes de que lleguen a la circulación. Esta teoría de "nutrición local" explicaría la hiperplasia secundaria a resección quirúrgica (17).

Lo que parece importante es tratar de determinar cuáles son los nutrientes capaces de regular este fenómeno. Las proteínas y los carbohidratos por vía oral evitan parcialmente la hipoplasia producida por la nutrición parenteral, pero las grasas son el

factor fundamental, ya que al suministrar oralmente un veinte por ciento de las necesidades calóricas diarias, en forma de triglicéridos de cadena larga, se observó que se producía crecimiento mucoso (18). En la nutrición parenteral, el aporte de ácidos grasos de cadena corta (acético, propiónico y butírico) es capaz de evitar la atrofia (19). Con la administración intraluminal de lípidos y carbohidratos también se ha observado un aumento de algunas hormonas gastrointestinales, como enteroglucagón y neurotensina, lo que sugiere que el efecto trófico podría estar mediado por estas sustancias (20).

Investigaciones recientes han dado un gran valor a los aminoácidos y en especial a la glutamina (21), pero se ha comprobado que la eficacia de las dietas poliméricas –como la que hemos utilizado en nuestro estudio– supera a las dietas monoméricas de glucosa, amino-ácidos, disacáridos y triglicéridos, en cuanto a la adaptación intestinal que se desarrolla tras resección (22).

Sin embargo, para Dowling (16), las variaciones en la nutrición modificarían las secreciones bilio-pancreáticas, que serían las responsables de la adaptación. Esta hipótesis ha sido corroborada recientemente (23). Las secreciones bilio-pancreáticas están reguladas por péptidos como el VIP (24), polipéptido pancreático (25), neurotensina (26), péptidos liberadores de gastrina (27), sustancia P (28), péptido Y (29) y bombesina (30). La comprobación reciente de la acción trófica del Factor de Crecimiento de Tipo Insulínico, que se secreta en el páncreas, apoya la participación humoral en el mecanismo de adaptación de las secreciones bilio-pancreáticas (31).

Parece claro que la presencia de nutrientes en el tubo digestivo es vital para el mantenimiento de una mucosa íntegra y para la compensación hiperplásica después de

resección, pero no conocemos los mecanismos moleculares que la regulan (15) ni muchos de los factores que influyen o pueden influir en la adaptación intestinal.

B) FACTORES ENDOCRINOS

HORMONAS NO GASTROINTESTINALES. En la rata se conocen desde hace muchos años los cambios que ocasionan el hipertiroidismo, la tiroidectomía, la hipofisectomía, la lesión hipotalámica y la administración de corticoides. Sin embargo, no ha habido muchos estudios recientes que se interesen por estas hormonas (17).

La **hipofisectomía**, en estudios experimentales en rata, ocasiona una hipoplasia y disminución del peso del intestino, que podría deberse a una inhibición de la alimentación oral. En algún trabajo se ha demostrado una reducción de niveles de gastrina y secretina, posibles responsables de esta pérdida (32).

Las **hormonas adrenales** tienen efectos variables, en relación con la dosis y el esteroide que se administre, así como con la especie animal. Los glucocorticoides aumentan la actividad enzimática del borde en cepillo de la vellosidad, pero provocan hipoplasia. Ejercen una acción opuesta sobre la estructura y la función, aumentando las funciones digestivas y absorbivas, pero disminuyendo la población celular (33).

La **hormona tiroidea** es fisiológicamente anabolizante al estimular la síntesis de proteínas y RNA. La administración de tiroxina es capaz de incrementar la actividad mitótica en el intestino. Esto no sucede en el animal hipofisectomizado, salvo si se

administra conjuntamente con hormona del crecimiento (GH), lo que demuestra que existe una interdependencia entre tiroxina y GH para ejercer su acción sobre el crecimiento gastrointestinal (17).

La **hormona del crecimiento**, tiene una acción trófica reconocida sobre el tracto digestivo, pero se desconoce si es el resultado de un estímulo directo o es secundaria a sus acciones –incremento de la ingesta, liberación de gastrina y mejora de los parámetros nutricionales (17). El descubrimiento del **Factor de Crecimiento Plerocercoide**, que tiene una actuación similar a la GH sin sus problemas diabetógenos, parece una posibilidad terapéutica válida ya que la administración de este factor ha aumentado la hiperplasia después de resección del setenta por cien de intestino de rata (34).

HORMONAS GASTROINTESTINALES. El estudio de los péptidos intestinales reguladores comenzó, hace casi un siglo, con el descubrimiento de la secretina por Bayliss y Starling (35). Poco más tarde se identificó la gastrina y no hubo más hallazgos durante décadas. En ese tiempo sólo se llegó a determinar, en los estudios morfológicos, que las células argentafines eran productoras de una secreción paracrina. A finales de los años sesenta, Pearse estableció que las células endocrinas intestinales eran capaces de producir péptidos hormonales por un proceso de captación y decarboxilación de precursores de aminas (células APUD). Se pensó que estas células derivaban de la cresta neural (36), pero parece claro que existe una célula progenitora en la cripta, que puede transformarse en cualquier tipo celular (37).

A los péptidos descubiertos inicialmente, secretina y gastrina, se añadió pronto la colecistoquinina y en los últimos años la lista se ha ampliado notablemente al descubrirse

otros muchos (23), por lo que se considera que el intestino es uno de los mayores órganos endocrinos del organismo.

Se han determinado células productoras de gastrina, secretina, colecistoquinina, polipéptido inhibidor gástrico (GIP), motilina, neurotensina, glucagón, somatostatina y serotonina (38). El enteroglucagón, el polipéptido pancreático (PP) y el péptido YY (PYY) son algunos de los péptidos restantes cuya existencia ha podido ser demostrada. Muchos se encuentran en las terminaciones nerviosas y actúan como neurotransmisores, como la galanina, el neuropéptido Y (NPY), las encefalinas, la bombesina, el péptido vasoactivo intestinal (VIP), el péptido liberador de gastrina (GRP) y el péptido relacionado génicamente a la calcitonina (CGRP). Otros, como la sustancia P, la colecistoquinina y la somatostatina, se localizan tanto en tejido neural como en células endocrinas.

Se ha demostrado la existencia de gránulos de secreción específicos para cada péptido producido en las distintas células. Cada célula secreta su péptido correspondiente, en respuesta a un estímulo concreto, intraluminal o mediado por neurotransmisores (20). Además, cada una de las hormona provoca un efecto individual sobre los distintos órganos diana. Por este motivo las hormonas y los neuropéptidos se denominan, ahora, péptidos reguladores (39).

SECRETINA.– Fue el primer péptido descubierto, pero aún se desconocen muchas de sus acciones directas. En el intestino de la rata, estimula la secreción de cloro y frena la absorción de sodio y bicarbonato; en el duodeno, la secretina y el VIP estimulan la secreción de bicarbonato. No se ha demostrado su participación directa en el trofismo intestinal y sólo se sabe que, cuando se administra crónicamente, aumenta ligeramente el

peso duodenal. En el colon previene el incremento de la síntesis de DNA causado por pentagastrina (40).

GASTRINA.– La estructura de este péptido gastrointestinal fue la primera que se pudo determinar. Pronto se afirmó que la gastrina poseía una acción trófica sobre el tracto digestivo (41), pero no todos los autores comparten esta teoría ya que no se ha encontrado hiperplasia mucosa en el síndrome de Zollinger–Ellison (16). Parece que es trófica en el intestino delgado y grueso, pero no en antro gástrico o en esófago (42). Produce hiperplasia por estímulo directo sobre la síntesis de DNA de las células germinales y no sobre las células maduras (43). Se ha demostrado que la perfusión luminal de gastrina aumenta la absorción intestinal en ratas (44) y que posee una acción trófica sobre cultivos celulares de epitelio intestinal embrionario humano (45).

COLECISTOQUININA.– La administración de esta hormona produce hipertrofia e hiperplasia en el páncreas y estimula la motilidad del intestino delgado y grueso. Por vía intravenosa es capaz de inhibir la ingesta en la rata y otros animales. Su acción principal la ejerce sobre la secreción pancreática y la contracción de la vesícula. Ejerce una acción liberadora sobre la insulina, el PPP, el GIP y la somatostatina.

A pesar de su similitud con la gastrina, no contribuye, al menos directamente, al trofismo intestinal (17).

SOMATOSTATINA.– Tiene una acción inhibidora. Frena la secreción gástrica, pancreática y la de gastrina (46). Inhibe, asimismo, la liberación de GH y otros muchos péptidos. Se ha podido demostrar su presencia en el colon humano mediante técnicas de inmunohistoquímica (47). La presencia de células endocrinas que almacenan

somatostatina es frecuente en el feto, pero es raro encontrarlas en el adulto y su función específica en el intestino no está bien estudiada (37). Se desconoce si sus acciones inhibitoras sobre el páncreas y sobre la mucosa del tracto digestivo se deben a la disminución de la liberación de péptidos tróficos o a una acción directa sobre las células precursoras.

POLIPÉPTIDO INHIBIDOR GÁSTRICO (GIP).– Se localiza en duodeno y yeyuno, fundamentalmente. Su concentración en íleon y colon es mucho menor. Sus principales acciones son inhibir la secreción gástrica, estimular la del intestino y aumentar la liberación de insulina pancreática. En algunos estudios (40), en páncreas aislado de rata, se ha comprobado que puede provocar liberación de glucagón inmunorreactivo, sólo con concentraciones de glucosa inferiores a 5,5 mM, así como estimular la liberación de somatostatina. No se han estudiado sus posibles efectos tróficos intestinales (40).

BOMBESINA.– Estimula la secreción de gastrina (48) y su administración (durante siete días a ratas sometidas a dieta líquida) ha demostrado estimular la síntesis de DNA y aumentar el contenido de DNA de la glándula oxíntica y de la mucosa del colon. El tratamiento de dos dosis/día durante siete días produjo un incremento de la proliferación de células productoras de gastrina y, como esta acción trófica no puede atribuirse a la gastrina, hay que pensar que es directamente causada por la bombesina, o bien por algún otro factor trófico liberado por ésta (49).

POLIPÉPTIDO YY (PYY) y POLIPÉPTIDO PANCREÁTICO (PP).– Son dos péptidos de estructura muy similar. El primero de ellos se ha podido encontrar en células endocrinas basales de íleon, colon y, abundantemente, en recto; estas células son distintas

de las que presentan inmunorreactividad de enteroglucagón. Ninguno de los dos ha atraído la atención de los investigadores a favor de su posible papel trófico. Se sabe que el PYY se libera en casos de malabsorción grasa cuando ésta alcanza el colon y que, en la rata, inhibe la secreción de cloro en el colon (50).

FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO.– Fue aislado hace treinta años, en las glándulas submaxilares del ratón. Se han encontrado receptores en los enterocitos de la rata. Estimula la síntesis de DNA en duodeno, íleon y colon de ratón. Es posible que intervenga en la maduración intestinal del recién nacido (51). Recientemente se ha demostrado que incrementa la proliferación epitelial de la mucosa digestiva desde el nacimiento hasta el estado adulto (52). Su mecanismo de acción podría ser por estímulo de la ornitin–decarboxilasa, enzima necesaria para la síntesis de poliaminas, que activa la síntesis de RNA mediante la activación de la RNA–polimerasa (53).

MOTILINA.– Actúa sobre la musculatura gastrointestinal lisa. Estimula la secreción de pepsina y la de cloro. No se le conocen efectos tróficos, pero provoca un aumento de la ingesta en el animal sometido previamente a ayuno (54).

NEUROPEPTIDOS.– La localización de péptidos en las terminaciones nerviosas intestinales sugiere una función fisiológica. Los candidatos a péptidos intestinales neurotransmisores deben cumplir los siguientes criterios:

- 1) Síntesis neuronal. 2) Almacenamiento. 3) Liberación. 4) Identidad farmacológica. 5) Inactivación. 6) Función fisiológica.

Los péptidos que satisfacen estas normas son los que podemos apreciar en el recuadro.

POLIPÉPTIDO INTESTINAL VASOACTIVO (VIP)
SOMATOSTATINA
NEUROPEPTIDO Y
SUSTANCIA P
GALANINA
METIONINA-ENCEFALINA
PÉPTIDO HISTIDINA-METIONINA
PÉPTIDOS INTESTINALES BOMBESINOIDES

El primero de ellos, el VIP, ha sido de los péptidos reguladores más estudiados. En ratas se ha visto que su acción sobre el colon puede estar mediada por activación del sistema AMPc-adenil-ciclasa. Además, se ha sugerido que puede influir en la diferenciación de células mononucleares o en la inmunosupresión (55). Produce relajación de musculatura lisa, vasodilatación, supresión de la proliferación de linfocitos T, y estimula la secreción del colon.

Si se ignora la participación del VIP y la de la somatostatina en la regulación del trofismo intestinal, mucho más desconocidas son las acciones del resto de los neuropéptidos, de los que, en algún caso, sólo se sabe que existen y su secuencia de amino-ácidos.

ENTEROGLUCAGÓN.– En 1971 se estudió un paciente con alteraciones de la motilidad y absorción del intestino, así como hiperplasia mucosa y niveles elevados de enteroglucagón en sangre, todo ello causado por un tumor renal productor de enteroglucagón (56, 57). Este hallazgo dirigió las investigaciones hacia su acción trófica intestinal.

En un principio se pensaba que las células A de los islotes de Langerhans pancreáticos eran el único lugar de producción del glucagón, pero tres grupos de investigadores descubrieron, por separado, que el plasma de perros pancreatectomizados totales contenía niveles normales o incluso elevados de un material que no se podía distinguir del glucagón pancreático con las técnicas de radioinmunoensayo (58). Este hallazgo hizo que se estudiase en profundidad el glucagón extrapancreático.

Se han encontrado células que contienen enteroglucagón distribuidas por todo el tracto digestivo, pero la mayor parte están localizadas en el íleon terminal y colon (59).

Se han determinado cuatro formas diferentes de enteroglucagón en el intestino humano. El de mayor peso molecular es similar a la glicentina porcina, de 69 amino-ácidos. En la mucosa del colon se ha aislado un segundo componente, el enteroglucagón II, idéntico a la secuencia C-terminal de la glicentina, y un tercero idéntico al glucagón pancreático. El cuarto puede tener la misma secuencia del pancreático más una extensión N-terminal.

El enteroglucagón II es el más activo y, en la rata, ha demostrado ser veinte veces más potente que el pancreático en estimular el AMPc (60).

En estudios experimentales realizados en rata se ha podido comprobar que el enteroglucagón interviene en la proliferación de las células de la mucosa del intestino delgado distal que se produce después de alimentar a ratas con una dieta rica en fibra fermentable (61).

También se han utilizado modelos de exclusión y de resección del setenta y cinco por cien de intestino proximal y se ha encontrado significativamente elevado el enteroglucagón plasmático tras doce días de la exclusión (62) y hasta seis semanas (63) e incluso hasta cuarenta y ocho días después de practicar la resección, con una meseta en el día veinticuatro de postoperatorio (64).

En otro estudio se ha demostrado una hiperfunción de células productoras de enteroglucagón después de resección intestinal (65).

De acuerdo con los resultados de estos trabajos se concluyó que el enteroglucagón tenía una acción trófica intestinal y actualmente se admite que es una auténtica enterotrofina (66). Sin embargo, aunque parece existir una correlación entre los niveles plasmáticos de enteroglucagón y el crecimiento de las vellosidades de la mucosa del intestino delgado distal (67), nadie ha podido, hasta ahora, demostrar que el enteroglucagón estimula directamente el crecimiento de la mucosa. Para probarlo sería necesario utilizar una preparación pura de enteroglucagón, que, al no haber sido sintetizado, no está aún disponible (68).

NEUROTENSINA.– Es un tridecapéptido que se aisló del hipotálamo bovino (69) y más tarde del intestino bovino (70). Posee la misma secuencia de amino-ácidos que la neurotensina humana, aislada en intestino delgado (71). Esta secuencia es

GLU-LEU-TYR-GLU-ASN-LYS-PRO-ARG-ARG-PRO-TYR-ILE-LEU

En la rata está localizada en un 90% en el intestino y el resto en el cerebro (72). Se ha encontrado en unas células de la mucosa intestinal (73), denominadas de tipo N, que contienen unos gránulos secretores en su porción basolateral próximos al capilar de la mucosa (74). La presencia de esta hormona se ha demostrado también en las fibras nerviosas de los plexos mientéricos del esófago, estómago, intestino delgado y colon (75).

Su administración por vía intravenosa es capaz de provocar todos los efectos que podemos apreciar en el recuadro inferior (23).

vasodilatación
↑ la permeabilidad vascular
hiperglucemia
hipoinsulinemia
hiper glucagonemia
potencia los barbitúricos
↑ prolactina, GH, ACTH, LH y FSH
relajación de la vesícula

La neurotensina hace que aumenten los niveles de glucemia (76) mediante un efecto estimulador sobre la liberación de glucagón (77).

Sus acciones sobre la motilidad intestinal, como el estímulo de la contracción rectosigmoidea y provocación de la defecación (78), están mediadas por un mecanismo neural y colinérgico.

Aumenta la permeabilidad capilar intestinal (79) y es capaz de liberar histamina de los mastocitos.

Cuando se administra en el sistema nervioso central previene la formación de úlceras de estrés (80).

A los treinta minutos de la ingesta o de la administración intraluminal de nutrientes se ha observado una elevación de los niveles de neurotensina (81), que puede llegar a ser de hasta tres y cuatro veces el valor basal (82), quizás por el estímulo del contenido intestinal sobre las células N.

El principal estímulo para la liberación de la neurotensina es la ingesta de grasa. A niveles circulantes normales, debe ser un mediador de algunas funciones que se estimulan por el aporte de grasa, como las que enunciamos a continuación:

Inhibición de la secreción y/o vaciado gástricos.
Potenciación de la secreción pancreática.
Estímulo de la secreción líquida intestinal.
Cambio del patrón de ayuno de la motilidad
intestinal al patrón de alimentación.
Incremento del flujo en la mucosa intestinal.
Aumento de la permeabilidad capilar intestinal.

Un papel potencial podría ser el de enterogastrona fisiológica mediadora de la secreción ácida tras la ingesta de grasa. Sin embargo, a niveles fisiológicos, todavía no se

ha demostrado ningún efecto (23). Sería, pues, improbable que la neurotensina fuese la principal enterogastrona circulante, puesto que los efectos sobre la absorción yeyunal se consiguen a concentraciones muy por encima de las fisiológicas.

En algunos trabajos recientes se sugiere su inclusión entre las hormonas tróficas intestinales (83) y se comprobó que la dosis de 300 $\mu\text{g/kg}$ era la más activa para estimular la síntesis de DNA de la mucosa intestinal (84).

Al estudiar su actuación sobre los fibroblastos humanos, no se ha podido demostrar su capacidad mitógena (85).

Grey ha observado hiperplasia asociada a la aparición de péptidos mitógenos, que estaban ligados al mecanismo de acción de los nutrientes intraluminales en la estimulación de proliferación. Observó que este fenómeno, que denominó "actividad estimulante del crecimiento" (GS activity), aparecía a las veinticuatro horas de una resección intestinal y duraba hasta el octavo día, en absoluta coincidencia con el aumento de timidina-kinasa (86). Más tarde (15), comprobó la presencia de estos péptidos en la realimentación tras ayuno y al iniciar la alimentación en el destete en la rata. Como en estas dos situaciones se desarrolla un aumento de la proliferación celular en el intestino delgado, este resultado podría ser la demostración de una relación entre estos dos factores del trofismo mucoso: la nutrición y la aparición de péptidos. Así pues, parece obvio que hay que continuar los trabajos de investigación para identificar estos péptidos.

C) FACTORES MUCOSOS

La mucosa requiere integridad de la flora bacteriana para renovar sus células epiteliales y algunos factores son capaces de alterar la actividad mitótica celular (87). La enteritis infecciosa causa hipoplasia con aumento de la proliferación y la migración celulares.

Después de una colectomía, con pérdida de la válvula ileocecal, se desarrolla una hiperplasia ileal. Se ha imputado a las bacterias del colon la responsabilidad de esta hiperplasia, pero la anastomosis del ciego al íleon también produce contaminación bacteriana y, sin embargo, sólo la colectomía produce hiperplasia (88). De cualquier modo, las bacterias sí producen cambios en la actividad enzimática, especialmente en la lactasa y también en otras disacaridasas (89).

En estudios realizados en ratas, la ingesta de alcohol ha demostrado ser estimulante de la proliferación celular e igualmente las radiaciones, aunque éstas producen inicialmente una inhibición de la actividad mitótica.

Es muy posible que algunos de los agentes que lesionan la mucosa intestinal produzcan una hipoplasia no sólo por alteración de la flora bacteriana, sino por alterar la absorción de algunas sustancias, como por ejemplo los folatos. En los alcohólicos se ha demostrado que existe un acortamiento de vellosidades que revierte con la administración de folatos y que restaura la actividad mitótica (90).

La presencia de un pH ácido en la superficie mucosa es importante para la absorción de folatos, dipéptidos y ácidos grasos. En el yeyuno proximal el pH suele ser de 6 y aumenta hasta 7,2 en el íleon distal. Tras la resección de yeyuno se ha comprobado un cambio del pH habitual ileal a un pH yeyunal, lo que demuestra una adaptación de la superficie ácida intestinal a la resección (91).

D) FACTORES NEUROVASCULARES

Se ha demostrado que la estimulación eléctrica de la innervación mesentérica tiene una acción potenciadora de la proliferación celular (92).

La vagotomía no produce alteraciones morfológicas y no hay suficientes estudios para comprobar su participación en el trofismo intestinal. Se ha señalado que la falta de atrofia mucosa, después de realizar una vagotomía, se debería a la elevación de niveles séricos de gastrina producida por la sección completa del vago. El aumento de la gastrina contrarrestaría los efectos de la vagotomía (93).

El sistema nervioso simpático también interviene en la regulación del crecimiento mucoso. La simpatectomía –química, inmunológica o quirúrgica– reduce la proliferación celular y, en los animales con nutrición parenteral, aumenta la hipoplasia (94).

Cuando se desarrolla una hiperplasia mucosa existe un aumento del flujo sanguíneo, pero no se puede precisar si es la causa o un simple reflejo de la hiperplasia. Algunos autores ponen en duda el papel del flujo sanguíneo y sólo se lo conceden como

vehículo de otros factores (95). Las variaciones del flujo podrían deberse a las funciones vasoactivas de los péptidos.

E) FACTORES QUIRÚRGICOS

La derivación bilio–pancreática, el by–pass yeyunal, la transposición íleo–yeyunal y la resección de yeyuno pueden ocasionar hiperplasia en el íleon.

La adaptación a la resección se realiza mejorando la absorción, mediante el aumento del número de células epiteliales, o ampliando la capacidad funcional de las células restantes.

La enterectomía ocasiona hiperplasia de las vellosidades, aumento de su altura y de la profundidad de la cripta, así como dilatación y elongación del resto del intestino. El primer resultado objetivo es el aumento del peso intestinal, por unidad de longitud, con dilatación y aumento de grosor de la pared (96).

Inicialmente, para estudiar la adaptación intestinal se ha usado la histomorfometría y los resultados han sido poco concluyentes; la medición de las vellosidades no ha representado un índice sensible y hay resultados con acortamiento (97), alargamiento (98), o tamaño normal (99). Estos estudios se llevan a cabo dos o más semanas después de la intervención porque la adaptación alcanza un pico de siete a doce días después de resección y persiste durante meses (92, 100). Algunos trabajos han presentado un índice de proliferación constante porque tanto el número total de células como el número de células proliferativas está aumentado en la cripta (100, 101, 102, 103). Sin embargo, en otros estudios, las actividades de disacaridasas y dipeptidasas se han encontrado

normales, e incluso disminuidas, después de la resección de intestino delgado, lo que podría indicar una inmadurez de las células de la mucosa hiperplásica (104,105).

Las consecuencias de la resección intestinal dependen fundamentalmente de:

1) La extensión de la resección; 2) la región resecada, intestino proximal, medio o distal; 3) la conservación o no de la válvula ileocecal; y 4) las condiciones de adaptación del intestino restante y la posibilidad de enfermedad en él (106).

En el by-pass intestinal se observa hiperplasia en el intestino que se mantiene en continuidad y una hipoplasia en el segmento desfuncionalizado, que se acompaña de una reducción progresiva de la absorción de glucosa y aminoácidos (107). Esta hipoplasia e hipofunción revierten al devolver el tránsito a ese segmento (108).

La derivación bilio-pancreática a la zona media del intestino delgado conlleva una hiperplasia ileal, con hipoplasia transitoria de la mucosa yeyunal al verse privada de la secreción bilio-pancreática. Esta respuesta es siempre menor que la observada después de resección intestinal (109).

En el intestino grueso la respuesta de adaptación ha sido mucho menos estudiada, aunque, en la rata, también se ha demostrado un aumento de la proliferación celular epitelial.

En la mucosa del colon la hiperplasia comienza 24-48 horas después de la resección de intestino proximal o medio (5, 110); es máxima de siete a catorce días después de la resección ileal (111); y a los tres meses es muy limitada (112). A los sesenta

días de la resección masiva de intestino delgado se ha demostrado una "intestinalización del colon" y, con microscopio electrónico de transmisión, se han visto modificaciones en los enterocitos del colon iguales a las observadas en las del resto de intestino delgado (113). Se ha comprobado experimentalmente que con esta adaptación el colon aumenta la absorción y el mecanismo puede ser a través del AMPc. El AMPc y el GMPc de la mucosa del colon se han encontrado disminuidos tras resecciones del cincuenta y ochenta por cien (114).

La colectomía subtotal produce una hiperplasia ileal, de menor intensidad que la causada por la yeyunectomía (88), y ocasiona un aumento de la absorción de agua y glucosa en el íleon. Este aumento se correlaciona con la elevación de la altura de la vellosidad (115, 116).

F) OTROS FACTORES

PROSTAGLANDINAS:

De forma experimental se demostró que las situaciones de carencia de prostaglandinas inducían ciertas alteraciones intestinales. Esto hizo pensar en el posible efecto trófico de las prostaglandinas y otros prostanoides (117). Además, se ha comprobado que los productos que inhiben su síntesis suprimen el efecto mitógeno de algunas hormonas y, también, se ha observado un cierto efecto trófico en algunos cultivos celulares; por otra parte, hay hormonas tróficas y factores de crecimiento no hormonales

que estimulan la síntesis de prostaglandinas. Estas tres observaciones apoyan su efecto trófico (118).

Los anti-inflamatorios no esteroideos, como la indometacina, son capaces de provocar daño mucoso intestinal, que puede llegar a la perforación. Estas lesiones son inhibidas al administrar, oral o parenteralmente, distintas prostaglandinas, incluyendo análogos de la PGE_2 o un análogo de la prostaciclina, la $6\beta\text{-PGI}_1$ (119). Este hecho también apoya su participación en el trofismo intestinal, bien sea directamente o por la acción de algún mediador.

En la enfermedad inflamatoria intestinal se ha observado un aumento de la síntesis de prostaglandina en la mucosa cólica y la indometacina, que inhibe su síntesis, no puede frenar ni prevenir la inflamación de la mucosa, con lo que no se puede concluir si las prostaglandinas son un agente inflamatorio o protector de la mucosa (120). Sin embargo, otros autores sí han encontrado datos a favor de considerarlas como agentes tróficos, al comprobar como la administración de PGE causa un aumento del peso seco del intestino delgado, tanto mayor cuanto más prolongado sea el periodo de administración. También se ha demostrado, a los catorce días de una resección intestinal del setenta por cien, un efecto estimulante de la respuesta de adaptación (121).

POLIAMINAS:

Algunos autores han señalado que las poliaminas son necesarias para el crecimiento celular normal. La ornitín-decarboxilasa cataliza la decarboxilación de la ornitina, para formar putresina, que es precursora de la espermidina y espermina, que se encuentran en todas las células eucariotas (122).

Aunque no se conoce con exactitud la función de las poliaminas, experimentos en ratas han mostrado que la ornitin-decarboxilasa aumenta en los estados en los que hay incremento del trofismo intestinal, como la lactancia y el destete (123), y en la resección intestinal (124). La inhibición de la ornitin-decarboxilasa suprime esta respuesta y limita el crecimiento de la mucosa intestinal en los modelos citados. Es decir, la ornitin-decarboxilasa y las poliaminas resultantes de su actividad parecen importantes para que se cree una respuesta de hiperplasia de adaptación en la mucosa intestinal (124). El mecanismo podría ser a través del aumento de la ornitin-decarboxilasa en la cripta, lo que desencadenaría la proliferación celular, y también en la vellosidad, lo que implicaría la diferenciación del enterocito.

En el colon es posible que exista una mayor concentración de poliaminas, debido a la decarboxilación bacteriana de la ornitina.

Una vez recordados los principales factores reguladores de la proliferación celular debemos, dado que es el objeto central de nuestro trabajo, prestar atención a la participación del colon en los mecanismos de adaptación.

FUNCIÓN DEL COLON EN LA REGULACIÓN DE LA ADAPTACIÓN A LA RESECCIÓN

Kosaka y Lim demostraron en 1930 que los extractos de mucosa del colon expuesta previamente a grasa eran capaces de inhibir la secreción gástrica y sospecharon que tenía un papel más importante que el de control del volumen y la propulsión de las heces (125).

La perfusión del colon con extractos hepáticos, oleato sódico o ácido clorhídrico inhibe la secreción ácida gástrica (126). En el hombre también se demostró la inhibición de la secreción gástrica y elevación plasmática de enteroglucagón al perfundir el colon con glucosa hipertónica, manitol o salino hipertónico (127). Otro trabajo mostró inhibición de la tripsina y lipasa pancreáticas y del bicarbonato, en el aspirado duodenal, tras la perfusión de ácido oleico (128). En un estudio realizado en ratas se pudo demostrar una elevación de los niveles de enteroglucagón en sangre, incremento de la proliferación celular en las criptas, y aumento del peso de la mucosa intestinal y del contenido de DNA y proteínas en intestino delgado después de perfundir el colon con glucosa (129). Todas estas acciones están reguladas por alguna hormona que ha sido denominada "cologastrona" (126).

También se ha podido demostrar la existencia de células endocrinas y péptidos en la mucosa colónica y en sus venas de drenaje (130).

Existen pocos estudios sobre los neurotransmisores en el colon, en cualquiera de las especies. Se sabe que todas las capas de la pared del colon contienen péptidos reguladores, la mayoría tienen un papel de neuromoduladores locales de las funciones intestinales (131), pero hay muchos todavía por descubrir.

Se ha demostrado la existencia de células endocrinas del tipo EC que contienen serotonina, células L que almacenan péptidos del tipo glucagón (GLI, *glucagon-like immunoreactivity*) y polipéptido pancreático, células D con somatostatina y células N que poseen neurotensina. Las acciones de los péptidos neuroendocrinos sobre el colon han sido bien descritas y se conoce que algunos –como el enteroglucagón, la somatostatina, el polipéptido pancreático y el péptido YY– ejercen acciones a distancia (37).

Ekblad realizó la revisión más completa de la inervación intrínseca del colon en la rata (132) y la distribución de los que intervienen en la motilidad intestinal ha sido estudiada recientemente (133).

Los efectos de la falta del colon también han sido estudiados y se ha comprobado que la colectomía es capaz de producir algunos cambios en el resto del tubo digestivo como, por ejemplo, un aumento transitorio de la secreción gástrica (134). Más tarde se comprobó que la colectomía total estimula la proliferación celular ileal y causa hiperplasia en esa zona, aumentando la capacidad de absorción del íleon, tanto en rata (116) como en clínica humana (135). La colectomía subtotal produce estos mismos cambios morfológicos en el íleon (88).

Con esta adaptación ileal se consigue que la ausencia del colon no cause una pérdida de líquidos igual a la cantidad que pasa diariamente del íleon al colon. La hiperplasia ileal que se produce sustituye, en parte, la función absortiva colónica. Esta hiperplasia compensadora no se produce en el yeyuno cuando falta el íleon y se elimina más cantidad de líquido que el que pasa de íleon a colon en circunstancias normales, probablemente por el exceso de sales biliares no absorbidas (136).

Para Kennedy, la reducción a la tercera parte del débito de una ileostomía tras colectomía, con respecto al flujo ileocecal normal, está mediada por la aldosterona (137).

Aunque existe algún estudio actual sobre la participación del colon en la adaptación a la resección masiva de intestino delgado (138), no existen trabajos recientes sobre la posible participación del colon restante en la regulación de la respuesta trófica que aparece en el intestino tras colectomía amplia.

3. MATERIAL Y MÉTODOS.

MATERIAL

EN LAS FASES I y II

ANIMALES

Hemos utilizado la rata macho adulta, de raza Wistar. Los animales proceden de la cría del estabulario del Servicio de Cirugía Experimental del Hospital La Paz.

INSTRUMENTAL QUIRÚRGICO

Pinzas de disección, hemostáticos, porta-agujas y tijeras de Mayo.

Caja de microcirugía con:

- Pinzas de disección rectas y curvas.
- Porta-agujas de Castroviejo.
- Tijeras.

Suturas:

- Seda "Mersilk" de 4/0 (Ethicon).
- Monofilamento de polipropileno "Surgilene" de 6/0 (Davis-Geck).
- Ácido poliglicólico "Dexon" de 3/0 (B. Braun-Dexon).

MATERIAL FUNGIBLE

- Hojas de bisturí nº 20.
- Tubos de silicona "Silastic" 602-135 (Dow-Corning).
- Catéteres de politeno "Endocath" de 1,5 mm (Plastimed).
- Conexión fija para catéteres 1,0-1,5 mm (Vygon).
- Llaves de 3 pasos.
- Jeringas de 1, 2, 5 y 10 ml (Fabersanitas/Beckton Dickinson).
- Agujas de 19G y 25G (Fabersanitas/Beckton Dickinson).
- Tubos de Eppendorf.
- Porta-objetos y cubre-objetos.
- Gasas, guantes y esparadrapo.

SUEROS Y FÁRMACOS

- Suero salino isotónico (lbys).
- Suero glucosado al 20% (lbys).
- Povidona yodada al 7.5% "Betadine" (Sarget).
- EDTA al 10%.
- Aprotinina "Trasylol" (Bayer).
- Heparina al 5% (Leo).
- Formol al 10% (Panreac).
- Éter anestésico "Vitulia" (Ern).
- Ketamina clorhidrato "Ketolar" (Parke Davis).
- Nitrógeno líquido.
- Neurotensina bovina (Cambridge Research Biochemicals).

APARATOS

- Frigorífico con congelador de -20°.
- Arcón de congelación a -50° "Sepatech" (Heraeus).
- Centrifugadora "Kubota 2010".
- Báscula "Digital Scale LE. 2066" (Letica).
- Balanza de precisión "Precisa 80A-200M (Swiss Quality).

EN LA FASE III

PROLIFERACIÓN CELULAR

- Fijador de Zamboni (Paraformaldehido al 2% en 0,1M buffer fosfato, de pH 7,4 y ácido pícrico, en PBS).
- Solución buffer PBS-sacarosa 15%.
- Parafina sólida.
- Inclusor en parafina "Autotechnicon Mono" (Technicon Corp., EEUU).
- Microtomo de parafina "Leitz".
- Porta y cubre-objetos.
- Glicerina.
- Poly-lysine 0,1% (Sigma).
- Hematoxilina-Eosina.
- Xilol.
- Alcohol 100%, 96%, 70% "Panreac".
- Agua destilada.

- H₂O₂ 0,3%.
- Solución tampón fosfato "PBS".
- Anticuerpo primario PCNA (Biomeda Corp., EEUU).
- IgG biotinilada anti-ratón (Dakopatts, Dinamarca).
- Complejo avidina-biotina "StreptABComplex/HRP" (Dakopatts, Dinamarca).
- Diaminobenzidina.
- Cloruro de cobalto.
- Carmín.
- Micropipetas:
 - * De 5 µl "Transferpette" (Brand, Alemania).
 - * De 0,5–10 µl "Extend" (Menarini, España).
 - * De 10–50 µl "Model 5000" (Nichiryo, Japón).
 - * De 200–1000 µl "Model 5000" (Nichiryo, Japón).
- Sistema morfométrico Videoplan (Kontron Bildanalyse), que consta de:
 - * Computadora PC con disco duro, monitor color y teclado.
 - * Tablero digitalizador y cursor.
 - * Microscopio "Axioscop" (Zeiss) provisto de cámara Sony conectada al sistema Videoplan.

NIVELES HORMONALES

MARCAJE DEL GLUCAGÓN y PURIFICACIÓN DEL ^{125}I -GLUCAGÓN

- Glucagón porcino (Lilly) disuelto en NaOH 0,1 N a concentración de 0,4 mg/ml.
- ^{125}I como yoduro sódico en sal de NaOH (pH 7-11), concentración de 100 mCi/ml (Radiochemical Center, Amersham, Gran Bretaña).
- Cloramina T, 20 mg disueltos en 5 ml de tampón fosfato 0,04M (pH 7,4).
- Yoduro potásico, 50 mg disueltos como la cloramina.
- Tampón de TRIS 0,08M, HCl 0,02N, NaCl 0,08N, albúmina humana 1%, aprotinina 20 uiC/ml (Ph 8,6).
- Tampón de TRIS 2M (pH 8,5).
- Tampón de fosfato 0,4M (pH 7,2).
- Tampón de fosfato 0,04M (pH 7,4).
- Columna de vidrio (60x1 cm).
- Silicona (siliclad, Clay-Adams).
- QAE - Sephadex A25 (Pharmacia).
- Bomba peristáltica (Buchler Instruments).
- Colector automático de fracciones (LKB).

TRATAMIENTO DEL PLASMA CON CARBÓN DEXTRANO

- Carbón (Norit-A).
- Dextrano 70 (Pharmacia).
- Glicina 0,2M (pH 8,8).
- Suspensión de carbón 2,5%, dextrano 0,25% en glicina 0,2M.

SISTEMA RADIOINMUNOLÓGICO

– Tampón de glicina 0,2M con albúmina humana 0,25% y suero de carnero 1% (pH 8,8).

– Con antisuero 30K se obtiene una dilución de 1/150.000 en un volumen final de incubación de 1,2 ml:

- Muestra de plasma 0,2 ml.
- Aprotinina 1.000 uiC (0,05 ml).
- ^{125}I -Glucagón 10pg (0,75 ml).
- Antisuero 30K, dilución 1/25.000 (0,2 ml).

– Con antisuero R8 se obtiene una dilución 1/51.000 ml en un volumen final de incubación de 1,2 ml:

- Muestra de plasma 0,05 ml.
- Aprotinina 1.000 uiC (0,05 ml).
- ^{125}I -Glucagón 10 pg (0,9 ml).
- Antisuero R8, dilución 1/8.500 (0,2 ml).

MÉTODOS

ANIMALES

Se seleccionaron animales sanos que no habían recibido ningún tratamiento previo al estudio. La edad de las ratas osciló entre doce y dieciséis semanas; el peso medio fue

Proteína bruta	18	%
Materia grasa bruta	3,5	%
Celulosa bruta	4	%
Cenizas brutas	8	%
Almidón	35	%
Calcio	1,2	%
Fósforo	0,7	%
Sodio	0,2	%
Vitamina A	10.000	UI/Kg
Vitamina D ₃	20.000	UI/Kg
Vitamina E - α tocoferol	15	UI/Kg

de 359,08 g (276–463 g, DE 34,68). En todos los casos utilizamos machos.

Todos ellos fueron alimentados con la misma dieta. Se trata de una dieta polimérica de Sandermus Producción (Sanders), cuya composición podemos apreciar en el recuadro adjunto. Además

tuvieron libre acceso a agua.

Desde su selección para el estudio, los animales se apartaron en grupos de cuatro o cinco, salvo las primeras veinticuatro horas de postoperatorio que transcurrieron en jaulas de aislamiento. Se mantuvieron, en todo momento, a 22^o–24^o de temperatura y con ciclos de luz–oscuridad de doce horas, mediante iluminación natural o artificial.

Para conseguir los treinta y seis animales del estudio fue necesario utilizar cincuenta y una ratas. Se practicó la autopsia a todas las que murieron en cualquier fase del experimento, y quedaron excluidas. Asimismo se desecharon todos los animales que en el momento de la obtención de las muestras intestinales presentaban signos de obstrucción intestinal o de isquemia.

GRUPOS

Se establecieron tres grupos de animales:

1. Grupo control, sin intervención y sin tratamiento. Doce animales.
2. Grupo de resección de colon derecho y transverso, sin tratamiento postoperatorio. Doce animales.
3. Grupo de resección de colon derecho y transverso, más tratamiento postoperatorio con neurotensina. Doce animales.

FASES

El presente trabajo ha sido realizado en 3 fases:

- I – Resección de colon derecho y transverso (grupos 2 y 3) y tratamiento postoperatorio, durante trece días, con neurotensina a dosis de 300 $\mu\text{g/Kg}$ cada 12 horas (grupo 3).
- II – Obtención de muestras de sangre e intestino.
- III – Procesado de las muestras y análisis estadístico de los resultados.

FASE I – Intervención.

PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO

- .– Anestesia inhalatoria con éter, utilizando una campana de vidrio en la inducción y un cono con gasa empapada en éter para el mantenimiento.
- .– Pesaje, rasurado del abdomen, limpieza con povidona yodada e inmovilización en decúbito supino, sujetando los miembros con esparadrapo.
- .– Laparotomía media. Liberación del íleon terminal y del colon transverso. Ligadura de vasos cólicos derechos y medios; ligadura de la arcada marginal en los límites de resección. Sección de íleon terminal a menos de 0,5 cm de la válvula ileocecal; sección del transverso. Extirpación de la pieza, medición y pesaje. Anastomosis término-terminal en un plano, con monofilamento de polipropileno 6/0. Cierre de la incisión con poliglicólico 3/0 en plano muscular y en piel.
- .– Después de la intervención se aplica calor al animal durante la recuperación.

TRATAMIENTO POSTOPERATORIO

- .– Durante las primeras veinticuatro horas sólo se les permite beber y, a partir de entonces, y durante trece días, se alimentan con la dieta de mantenimiento para ratas de laboratorio.
- .– En los grupos 1 y 2, de control y de resección sin tratamiento, no se administra ninguna medicación.
- .– En el grupo 3 se inyecta neurotensina subcutánea a dosis de 300 µg/kg diluidos en 1 ml de suero salino cada 12 horas, durante los 13 días siguientes a la intervención. El día 14 se realiza la toma de muestras.

FASE II – Extracción de muestras.

PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO

- .- Después de la anestesia y pesaje del animal se rasura la región anterior del cuello y el abdomen. Se realiza una pequeña incisión dorsal interescapular, otra cervical anterior en la línea media y una tercera en el abdomen. A través de la incisión interescapular se introducen dos catéteres, uno de silicona, que se tuneliza por el subcutáneo hasta la incisión cervical, y otro de politeno, que se tuneliza hasta el abdomen. Los catéteres se fijan a la piel de la región dorsal mediante sutura.
- .- A través de la herida cervical anterior se disecciona la arteria carótida izquierda. Se introduce el catéter de silicona y se cierra la incisión.
- .- En el abdomen se penetra en cavidad y se atrae el estómago. A través de la pared gástrica se introduce el catéter duodenal y se cierra la cavidad.
- .- Se aplica calor y se permite la recuperación del animal, durante al menos una hora, para que el éter se metabolice y no interfiera en la determinación de hormonas en plasma.

EXTRACCIÓN DE LA PRIMERA MUESTRA DE SANGRE

- .- Para obtener una muestra correcta se requieren 10 μ l de EDTA al 10% y 20 μ l de Aprotinina por cada ml de sangre que se extrae. El volumen mínimo de sangre que se ha de procesar es de 2,5 ml. La extracción se realiza con una jeringa que contiene 25 μ l de EDTA y 50 μ l de Aprotinina.
- .- La sangre se centrifuga a 3.500 r.p.m. durante 15 minutos. Inmediatamente después se congela el plasma.

- .- Se inyectan, para reponer la volemia del animal, 1,5 ml de suero salino heparinizado con 3 U/ml y el concentrado de hematíes sobrante de la centrifugación.

SOBRECARGA DE GLUCOSA

- .- Finalizada la extracción de sangre, se administran 1,75 g/kg de glucosa, a través del catéter duodenal.

EXTRACCIÓN DE LA SEGUNDA MUESTRA DE SANGRE

- .- A los 45 minutos de la sobrecarga duodenal de glucosa se realiza una nueva extracción de sangre. Se sigue la misma técnica que en la primera, pero se obtienen 5 ml en una jeringa con 50 μ l de EDTA 10% y 125 μ l de Aprotinina.
- .- Se repone la volemia con 5 ml de suero salino.

OBTENCIÓN DE MUESTRAS DEL INTESTINO

- .- El animal se anestesia con Ketamina (50 mg/Kg) por vía arterial.
- .- Se realiza una amplia apertura de la cavidad abdominal.
- .- Se toman muestras:
 - Del yeyuno, a 1 cm del Treitz.
 - Del íleon, a 3 cm de la anastomosis ileocólica.
 - Del colon, 1 cm más allá de la sutura.
- .- De cada uno de estos segmentos se toma una sección de 1 cm para estudio anatomo-patológico y se sumergen en solución fijadora de Zamboni.

.– Después de la recogida de muestras del intestino se sacrifica el animal mediante sobredosis de ketamina.

FASE III – Procesado de las muestras.

PROLIFERACIÓN CELULAR

Para evaluar la proliferación celular se ha realizado una técnica inmunohistoquímica que consiste en el estudio de un antígeno determinado, el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA, *proliferating cell nuclear antigen*), mediante el empleo de un anticuerpo primario. El PCNA revela todas las células que están en fase proliferativa.

También se tiñeron cortes de todas las muestras con hematoxilina-eosina.

Se obtuvieron muestras de todos los animales de todos los grupos y en cada preparación se hicieron 20 recuentos.

.- El día de la toma de muestras se introducen las secciones de un centímetro de yeyuno, íleon y colon, en solución fijadora de Zamboni durante 24 horas.

.- Se pasan a una solución de lavado de buffer fosfato sacarosa (PBS-sacarosa). Posteriormente, se incluyen en parafina y se cortan a 4 μ m.

.- Los cortes se lavan en agua. Los portas se tratan con glicerina, si la tinción se va a hacer con hematoxilina-eosina, o con poly-lysine al 0,1%, en las muestras de inmunohistoquímica.

.- Tinción de hematoxilina-eosina.

.- Inmunotinción

* Primer día:

- Se desparafinan y rehidratan los cortes. Para ello se sumergen dos veces en xilol durante 5 minutos; después en alcohol a

concentraciones decrecientes: alcohol 100% (3x5'), alcohol 96% (1x5'), alcohol 70% (1x5'). Agua destilada (2x5').

- Se mantienen en solución de H_2O_2 al 0.3% durante 30 min y luego se lavan en PBS (3x5').

- Se secan los portas y se añade el anticuerpo primario, que se une a todas las células en proliferación.

- Se mantiene en ambiente húmedo a 4°C durante 24 horas.

* Segundo día:

- PBS (3x5').

- Se añade la IgG biotinilada anti-ratón y se deja 30 minutos en ambiente húmedo.

- PBS (3x5').

- Se añade el complejo avidina-biotina con:

- * Reactivo A (estreptavidina), 45 μ l.

- * Reactivo B (biotina-peroxidasa), 45 μ l.

Se añaden a 5 ml de PBSTriton con albúmina.

Ambos reactivos vienen preparados de la misma forma: 1 ml en PBS 0,01M; 0,15 M de ClNa; 15 mM N_3Na ; pH 7,2.

- PBS (3x5').

- Tinción con diaminobenzidina mezclada con cloruro de cobalto.

- PBS (3x5').

- Agua destilada (2x5').

- Se colocan las preparaciones en carmín (15") para resaltar los núcleos. Se lavan en agua y se pasan por agua destilada (1x5').

- Deshidratar los cortes, en serie creciente de alcoholes, 70% (1x5'), 100% (3x5') y Xilol (2x5').
- Fijar los cubre-objetos.

.– Estudio de los cortes:

- Los cortes son visualizados en microscopio, a 40 aumentos, que se conecta, mediante una cámara, a ordenador PC con software Videoplan.
- El recuento de los núcleos teñidos se efectúa en las criptas. Se cuentan las mitosis, en las preparaciones teñidas con hematoxilina-eosina, y el número de núcleos teñidos de color pardo, resultado de la inmunotinción.
- También se cuenta el número total de núcleos por área predefinida.
- Se determina un índice de mitosis. Este índice de proliferación se corresponde con: **n° de células en proliferación x 100 / n° total de núcleos x área definida**. Para evitar el manejo de los resultados en numeración decimal se multiplican los índices por 10^6 .

NIVELES HORMONALES

Se han determinado glucagón y péptidos inmunológicamente análogos, usando dos antisueros. El 30K, cedido por el Dr. Unger, de la Universidad de Texas, Dallas; y el R8, cedido por la Dra. Villanueva, de la Clínica Puerta de Hierro, Madrid.

El antisuero 30K se obtiene a partir de glucagón bovino y porcino inyectados al conejo. Es de los anticuerpos C-terminales, que reacciona con la parte carboxi-terminal 18-29 del glucagón.

El antisuero R8, obtenido de forma similar, reacciona con el glucagón y los **GLI** (*glucagon-like immunoreactivity*) de los extractos intestinales. Este antisuero R8 es un anticuerpo N-terminal, que reacciona escasamente con el fragmento carboxi-terminal del glucagón.

DETERMINACIÓN DEL GLUCAGÓN

Se basa en el desplazamiento de la hormona radioactiva por la no radioactiva en su unión a una cantidad limitada de anticuerpo. Así, si aumenta la concentración de hormona, disminuye la unión de la hormona radioactiva al anticuerpo.

El método de determinación del glucagón es muy laborioso y requiere los pasos que se describen a continuación.

PREPARACIÓN DEL GLUCAGÓN RADIATIVO

.- Se realiza un marcaje con ^{125}I , que se incorpora al glucagón mediante una reacción de sustitución, con cloramina T como agente oxidante. El iodo oxidado se incorpora a los residuos de tirosina de la molécula de glucagón.

.- Se purifica retirando el glucagón no marcado o aquél que tiene dos átomos de ^{125}I y el ^{125}I libre. El glucagón, con sus dos tirosinas iodadas, no se elimina y para conseguir glucagón monoiodado se utiliza una proporción muy pequeña de ^{125}I .

.- Se determina el porcentaje de ^{125}I incorporado al glucagón por precipitación de una alícuota de la mezcla radioactiva con ácido tricloroacético al 5%.

El valor obtenido osciló entre 70–80%.

PURIFICACIÓN DEL ^{125}I -GLUCAGÓN

.- Se determina el grado de pureza del glucagón radioactivo mediante precipitación de una alícuota de glucagón mismo con ácido tricloroacético al 5%.

Se obtuvieron valores entre 98–100%.

La actividad específica del glucagón se calculó mediante la ecuación:

$$\text{Activ. Especif. } ^{125}\text{I-Glucagon} = \frac{\text{Activ. Especif. } ^{125}\text{I} \times \text{P.M. iodo}}{\text{P.M. glucagon}}$$

.- Como la actividad específica del ^{125}I varía de un lote a otro de unos 15–17 mCi/ μg de iodo, la actividad específica del glucagón radioactivo se calcula determinando el número de cuentas/minuto de una alícuota del mismo y aplicando la siguiente ecuación:

$$C = \frac{\text{CMP} \times D \times 1000}{\text{Act. Esp.} \times 2,22 \times 10^6 \times P \times V}$$

C	= concentración de ^{125}I -Glucagón ($\mu\text{g/ml}$)	$2,22 \times 10^6$	=depreciaciones por minuto de $1\mu\text{Ci}$
CPM	= cuentas por minuto de la alícuota	E	= eficiencia del contador
D	= dilución de la alícuota	P	= factor de pérdida de actividad del ^{125}I con respecto al día de calibración (%)
Act.esp.=	activ. específica del ^{125}I -Glucagón ($\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$)	V	= volumen de la alícuota (ml)

TRATAMIENTO DEL PLASMA CON CARBÓN-DEXTRANO

El carbón tratado con dextrano adsorbe, selectivamente, pequeños péptidos como el glucagón, excluyendo otras moléculas.

.- Se obtiene 1 ml de suspensión de carbón 2,5%, dextrano 0,25% en glicina 0,2 M.

.- Se centrifuga 5 min. a 2.500 rpm. Después se añade 1 ml de plasma, se agita 1 hora a 4°C, se centrifuga 15 min. a 2.500 rpm a 4°C y se mantiene a -20°C para ulterior análisis radioinmunológico.

.- Se añaden todos los elementos radioinmunológicos y se incuban cuatro días a 4°C.

.- Se separa el complejo anticuerpo-¹²⁵I-Glucagón.

SEPARACIÓN POR CARBÓN-DEXTRANO

El carbón saturado con dextrano adsorbe, selectivamente, la hormona radioactiva libre.

.- Se añade suero de carnero a la muestra para igualar la concentración proteica.

.- Se añade el carbón-dextrano (0,5 ml) y se incuba 45 min. a 4°C.

.- Se centrifuga 6 min. a 3.000 rpm y 4°C, separando la fracción líquida y quedando el sedimento de carbón que ha adsorbido la hormona radioactiva libre.

SISTEMA RADIOINMUNOLÓGICO

Todas las muestras fueron analizadas por duplicado una vez añadidos todos los elementos del sistema radioinmunológico.

.- Se incubaron 4 días a 4°C, en tubos de vidrio de 7x9 cm.

.- Más tarde se separó el complejo anticuerpo-¹²⁵I-Glucagón.

CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

.- Se determina la radioactividad libre en el sedimento de carbón, con un contador de emisiones gamma, e igualmente la radioactividad total de los 10 pg de ^{125}I -Glucagón, que se utilizaron para el análisis de cada muestra.

.- Se calcula el porcentaje de unión de ^{125}I -Glucagón al anticuerpo, %B, según la fórmula:

$$\%B = \frac{CPM_c - CPM_m}{CPM_c} \times 100$$

CPM_m = radioactividad presente en el sedimento de carbón

CPM_c = radioactividad presente en el sedimento de la muestra análoga sin anticuerpo

La unión inespecífica del ^{125}I -Glucagón (%B inespecífico), en las muestras a las que no se añadió anticuerpo, se obtuvo mediante la fórmula:

$$\%B = \frac{CPM_t - CPM_e}{CPM_t} \times 100$$

CPM_e = radioactividad presente en el sedimento de la muestra control de la unión inespecífica sin anticuerpo

CPM_t = radioactividad total de los 10 pg de ^{125}I -Glucagón

La unión inespecífica está relacionada con la integridad de la molécula de ^{125}I -Glucagón y con la contaminación con yodo libre. En las muestras este porcentaje de unión inespecífica fue $< 10\%$.

La representación gráfica del %B de las muestras estándar frente al logaritmo decimal de su concentración correspondiente da lugar a una curva sigmoidea, que se utiliza para la lectura de la concentración en las muestras de plasma.

SENSIBILIDAD DEL RADIOINMUNOANÁLISIS

Se define como la mínima cantidad media que es posible distinguir de cero. Con el anticuerpo 30K se obtuvo una sensibilidad de 12,5 pg/ml. Con el anticuerpo R8 fue de 50 pg/ml.

VALORACIÓN DEL GLUCAGÓN

.- Se determina restando el valor obtenido con el plasma tratado del valor obtenido con el plasma sin tratar.

El valor determinado con el plasma tratado con carbón-dextrano corresponde a componentes glucagón inmunorreactivos de alto peso molecular (BPG o macroglucagón).

VALORACIÓN DE LOS GLI (*GLUCAGON-LIKE IMMUNOREACTIVITY*)

Se calculó restando el valor obtenido de la mediación específica del glucagón pancreático, del total de la inmunorreactividad del glucagón N-terminal. El antisuero R8 reacciona con el glucagón y, además, con péptidos GLI intestinales de 3.500–12.000 daltons, y con otros péptidos de alto peso molecular (> 20.000 daltons). La valoración se realizó estableciendo la diferencia entre los valores obtenidos con el anticuerpo R8 con y sin carbón-dextrano y a este valor se restó el obtenido en el cálculo del glucagón.

ESTUDIO ESTADÍSTICO

En cada serie de resultados, de los recuentos de núcleos y de índices de proliferación, se obtuvieron las medias, desviaciones estándar y el error estándar de la media.

Se realizó una comparación estadística entre los tres grupos de estudio utilizando el método de la *t de Student*.

Las series de datos de los niveles hormonales en todos los grupos fueron sometidas al mismo estudio estadístico.

4. RESULTADOS.

MORTALIDAD

La mortalidad operatoria fue del 29,60% (15 de las 51 ratas).

Hubo 12 muertes postoperatorias. Nueve de ellas por obstrucción intestinal (1 en cada uno de los días 4º, 5º, 9º, 10º, 11º y 13º de postoperatorio y 3 ratas más en el día 14º). Otras dos por dehiscencia precoz (2º y 4º días). Una más, el primer día de postoperatorio por isquemia secundaria a torsión de todo el paquete intestinal.

Tres animales murieron durante la intervención, en los intentos de canalizar la arteria carótida, el día de la toma de muestras.

Excluidas las quince ratas muertas, quedan las treinta y seis objeto del estudio.

PÉRDIDA DE PESO

Las ratas se pesaban al comenzar el estudio y antes de la toma de muestras, catorce días después. El peso inicial osciló entre 276 y 463 g. La media fue de 359,08 g. y la D.E. de 38,68.

Grupo de resección.

Media de pesos del día de la intervención: 351,16 g \pm 35,83.

Media de los pesos del día de la toma de muestras: 320,79 g \pm 32,46.

La comparación estadística de estos pesos demuestra una pérdida de peso significativa ($p < 0,001$).

El colon derecho y transversal extirpado pesaba de 13 a 17 gramos, con una media de 14 g., en toda la serie. Cuando del peso inicial descontamos el peso de la pieza extirpada hubo variación en la significación estadística.

En el grupo de resección, la media de los pesos corregidos (restado el peso de la pieza del peso total) fue de 337,16 g. \pm 35,83. Comparada con la del día de la toma de muestras (320,79 g \pm 32,46) revela una pérdida de peso todavía significativa ($p < 0,05$) [Tabla 1].

RESECCIÓN	PESO A 14 DÍAS	SIGNIFICACIÓN
P. PREOPERATORIO: 351,16 \pm 35,83	320,79 \pm 32,46	$p < 0,001$
P. CORREGIDO: 337,16 \pm 35,83		$p < 0,05$

Tabla 1. Media \pm desviación estándar de los pesos y pesos corregidos, en gramos, en el grupo de resección, comparada con la media de los pesos del día del sacrificio.

Grupo de resección más tratamiento con neurotensina.

Media de pesos del día de la intervención: $347,82 \text{ g} \pm 17,80$.

Media de los pesos del día del sacrificio: $325,55 \text{ g} \pm 15,22$.

Las diferencias entre ambas medias fueron significativas ($p < 0,001$).

En este grupo la media de pesos corregidos fue de $333,82 \text{ g} \pm 17,80$.

Comparada con la del día del sacrificio ($325,55 \pm 15,22$) proporcionó un resultado de **pérdida de peso no significativa** ($p = 0,08$) [Tabla 2].

R+ NEUROTENSINA	PESO A 14 DÍAS	SIGNIFICACIÓN
P. PREOPERATORIO: $347,82 \pm 17,80$	$325,55 \pm 15,22$	$p < 0,001$
P. CORREGIDO: $333,82 \pm 17,80$		$p > 0,05 \text{ (N.S.)}$

Tabla 2. Media \pm DE de los pesos y pesos corregidos del grupo de resección más neurotensina comparada con los pesos del día del sacrificio.

En la comparación de las cifras de peso perdido entre los dos grupos obtuvimos menor pérdida de peso en el grupo de resección más neurotensina ($p = 0,034$):

	RESECCIÓN + NEUROTENSINA: GRAMOS PERDIDOS
RESECCIÓN: GRAMOS PERDIDOS	$p < 0,05$

En el grupo control no se produjeron pérdidas ni ganancias valorables de peso.

PROLIFERACIÓN CELULAR

Los recuentos celulares se realizan sobre la muestra de yeyuno, íleon y colon y los resultados reflejan un índice de proliferación que se corresponde con una relación del número de mitosis y núcleos hallados en una superficie definida.

ÍNDICE DE MITOSIS. PCNA.

MUESTRA DE YEYUNO			
GRUPO	MEDIA	D.E.	E.E.M.
CONTROL	405,7	160,77	35,95
RESECCIÓN	875,4	312,61	69,90
RESECCIÓN + NEUROTENSINA	3399,5	533,47	119,29

Tabla 3. Índice mitótico en las muestras de yeyuno: medias, desviación estándar y error estándar de la media.

	CONTROL	RESECCIÓN	RESECCIÓN + NEUROTENSINA
CONTROL		p < 0,0001	p < 0,0001
RESECCIÓN	p < 0,0001		p < 0,0001
RESECCIÓN + NEUROTENSINA	p < 0,0001	p < 0,0001	

Tabla 4. Estudio de significación estadística en las muestras de yeyuno.

En las muestras de yeyuno se observa un incremento del índice mitótico en el grupo de resección con respecto al de control. Al comparar el grupo de resección con el de

resección más tratamiento con Neurotensina, comprobamos un nuevo aumento del índice mitótico. En la comparación estadística los resultados son altamente significativos.

MUESTRA DE ÍLEON			
GRUPO	MEDIA	D.E.	E.E.M.
CONTROL	828,85	531,32	118,82
RESECCIÓN	1536,50	468,81	104,83
RESECCIÓN + NEUROTENSINA	3987,5	452,93	101,28

Tabla 5. Índice mitótico en las muestras de íleon: medias, desviación estándar y error estándar de la media.

	CONTROL	RESECCIÓN	RESECCIÓN + NEUROTENSINA
CONTROL		p < 0,0001	p < 0,0001
RESECCIÓN	p < 0,0001		p < 0,0001
RESECCIÓN + NEUROTENSINA	p < 0,0001	p < 0,0001	

Tabla 6. Estudio de significación estadística en las muestras de íleon.

En las muestras de íleon, apreciamos mayor proliferación celular en el grupo de resección que en el de control; a su vez, comparando el grupo de resección con el de resección más Neurotensina, la proliferación es mayor en el segundo.

En el íleon, los resultados son, también, altamente significativos.

MUESTRA DE COLON			
GRUPO	MEDIA	D.E.	E.E.M.
CONTROL	491,65	200,95	44,93
RESECCIÓN	1575,5	379,98	84,97
RESECCIÓN + NEUROTENSINA	3889,25	632,64	141,46

Tabla 7. Índice mitótico en las muestras de colon: medias, desviación estándar y error estándar de la media.

	CONTROL	RESECCIÓN	RESECCIÓN + NEUROTENSINA
CONTROL		p < 0,0001	p < 0,0001
RESECCIÓN	p < 0,0001		p < 0,0001
RESECCIÓN + NEUROTENSINA	p < 0,0001	p < 0,0001	

Tabla 8. Estudio de significación estadística en las muestras de colon.

El índice mitótico es, en el colon, superior en el grupo de resección que en el de control. La administración de Neurotensina, tras resección, produce una elevación de los valores del índice, en comparación con el grupo de resección sin tratamiento.

La comparación estadística, en las muestras de colon, ofrece, de nuevo, diferencias altamente significativas.

ÍNDICE DE MITOSIS. HEMATOXILINA-EOSINA.

MUESTRA DE YEYUNO			
GRUPO	MEDIA	D.E.	E.E.M.
CONTROL	227,06	97,98	24,49
RESECCIÓN	255,47	113,19	27,45
RESECCIÓN + NEUROTENSINA	347,65	91,77	20,52

Tabla 9. Índice mitótico en las preparaciones de yeyuno teñidas con Hematoxilina-Eosina: medias, desviación estándar y error estándar de la media.

	CONTROL	RESECCIÓN	RESECCIÓN + NEUROTENSINA
CONTROL		N. S.	p < 0,001
RESECCIÓN	N. S.		p < 0,01
RESECCIÓN + NEUROTENSINA	p < 0,001	p < 0,01	

Tabla 10. Estudio de significación estadística en las muestras de yeyuno.

Se advierte un cierto incremento en la media del grupo de resección con respecto al de control, que no es estadísticamente significativo. En el grupo de animales tratados con Neurotensina, el índice es significativamente mayor que en los otros dos.

MUESTRA DE ÍLEON

GRUPO	MEDIA	D.E.	E.E.M.
CONTROL	195,24	65,26	15,83
RESECCIÓN	272,75	92,93	20,78
RESECCIÓN + NEUROTENSINA	285,35	145,93	32,63

Tabla 11. Índice mitótico en las preparaciones de íleon teñidas con Hematoxilina-Eosina: medias, desviación estándar y error estándar de la media.

	CONTROL	RESECCIÓN	RESECCIÓN + NEUROTENSINA
CONTROL		p < 0,01	p < 0,01
RESECCIÓN	p < 0,01		N. S.
RESECCIÓN + NEUROTENSINA	p < 0,01	N. S.	

Tabla 12. Estudio de significación estadística en las muestras de íleon.

La proliferación celular es mayor tras resección de colon. La Neurotensina no provoca elevación significativa de las mitosis en el íleon.

La comparación estadística entre el grupo con resección y el grupo control revela resultados significativos.

MUESTRA DE COLON

GRUPO	MEDIA	D.E.	E.E.M.
CONTROL	194,11	54,83	12,58
RESECCIÓN	226,10	74,90	16,75
RESECCIÓN + NEUROTENSINA	264,20	133,30	29,81

Tabla 13. Índice mitótico en las preparaciones de colon teñidas con Hematoxilina-Eosina: medias, desviación estándar y error estándar de la media.

	CONTROL	RESECCIÓN	RESECCIÓN + NEUROTENSINA
CONTROL		N. S.	$p < 0.05$
RESECCIÓN	N. S.		N. S.
RESECCIÓN + NEUROTENSINA	$p < 0.05$	N. S.	

Tabla 14. Estudio de significación estadística en las muestras de colon.

No se encuentran diferencias significativas entre el grupo de resección y el de control, ni entre el de resección más tratamiento y el de resección. Sólo la comparación entre el grupo de resección más tratamiento y el de control muestra un aumento significativo en el índice mitótico.

GLUCAGÓN, GLI Y ENTEROGLUCAGÓN

Valores basales de glucagón:

30K

Corresponden, aproximadamente, a la media de los niveles de glucagón + proglucagón 1-61.

Control pg/ml	Resección de colon pg/ml	Resección + Neurotensina pg/ml
201	239	371

En el grupo de resección de colon más tratamiento postoperatorio con neurotensina es donde se produce el nivel basal más elevado.

Valores de glucagón post-sobrecarga de glucosa:

30K

Control pg/ml	Resección de colon pg/ml	Resección + Neurotensina pg/ml
342	777	923

Se aprecia una gran elevación de los valores en los grupos con resección.

Incremento de glucagón:

30K Post – 30K Basal

Control pg/ml	Resección de colon pg/ml	Resección + Neurotensina pg/ml
141	538	372

Nuevamente, el mayor resultado se obtiene en los grupos con resección.

Valores basales de GLI:**R8**

Corresponden, aproximadamente, a la media de los niveles de glicentina + oxintomodulina + glucagón + proglucagón 1-61.

Control pg/ml	Resección de colon pg/ml	Resección + Neurotensina pg/ml
1033	854	763

El nivel de GLI basal más elevado se produce en el grupo control.

Valores de GLI post-sobrecarga de glucosa:**R8**

Control pg/ml	Resección de colon pg/ml	Resección + Neurotensina pg/ml
2291	1968	1336

En el grupo control y en el de resección de colon hay mayor elevación de los niveles de GLI tras la sobrecarga de glucosa.

Incremento de GLI:**R8 Post- R8 Basal**

Control pg/ml	Resección de colon pg/ml	Resección + Neurotensina pg/ml
1258	1114	573

El mayor incremento de las cifras medias de GLI se observa en los valores de los grupos que no han recibido tratamiento con neurotensina: Grupo control y de resección de colon.

Valores basales de enteroglucagón:

R8 basal – 30K basal

Las cifras que presentamos corresponden a las de GLI menos las de glucagón.

Control pg/ml	Resección de colon pg/ml	Resección + Neurotensina pg/ml
702	615	392

La media de resultados de enteroglucagón más elevada se da en el grupo control.

Valores de enteroglucagón post-sobrecarga de glucosa:

R8 Post – 30K Post

Control pg/ml	Resección de colon pg/ml	Resección + Neurotensina pg/ml
2013	1199	379

De nuevo es el grupo control el que ofrece las cifras más elevadas.

Incremento de enteroglucagón:

[R8-30K Post] – [R8-30K Basal]

Control pg/ml	Resección de colon pg/ml	Resección + Neurotensina pg/ml
1310	575	336

El mayor incremento en las cifras medias de los niveles de enteroglucagón se aprecia en el grupo control, seguido del grupo de resección de colon. En el grupo de resección más neurotensina no existe apenas diferencia entre los incrementos de las cifras basales y post-sobrecarga de glucosa.

ESTUDIO ESTADISTICO

La sobrecarga de glucosa produjo un incremento significativo en las cifras de GLI en todos los grupos:

R8	CONTROL – postsobrecarga
CONTROL – basal	p = 0,004

R8	RESECCIÓN – postsobrecarga
RESECCIÓN – basal	p = 0,012

R8	RESEC. + NEUROTENSINA post.
RESEC. + NEUROTENSINA basal	p = 0,001

GLI basal:

R8 basal			
Grupo	CONTROL	RESECCIÓN	RESEC. + NEUROTENSINA
Media	1033,08	854	762,91
D.E.	421,77	412,44	261,47
E.E.M.	121,76	119,06	78,84

RESECCIÓN		
RESEC. + NEUROTENSINA	N.S. (p = 0,5)	
CONTROL	N.S. (p = 0,3)	N.S. (p = 0,08)
	RESECCIÓN	RESEC. + NEUROTENSINA

GLI post-sobrecarga de glucosa:

R8 post-sobrecarga de glucosa			
Grupo	CONTROL	RESECCIÓN	RESEC. + NEUROTENSINA
Media	2290,83	1967,92	1335,91
D.E.	1297,74	1347,94	414,46
E.E.M.	374,63	389,12	124,96

RESECCIÓN		
RESEC. + NEUROTENSINA	N.S. (p = 0,1)	
CONTROL	N.S. (p = 0,5)	p < 0,05
	RESECCIÓN	RESEC. + NEUROTENSINA

ENTEROGLUCAGÓN

Comparación entre los valores basales de enteroglucagón:

R8 – 30K basal			
Grupo	CONTROL	RESECCIÓN	RESEC. + NEUROTENSINA
Media	702,36	615,33	391,91
D.E.	352,18	381,72	316,55
E.E.M.	106,19	110,19	95,44

RESECCIÓN		
RESEC. + NEUROTENSINA	N.S. (p = 0,1)	
CONTROL	N.S. (p = 0,5)	p < 0,05
	RESECCIÓN	RESEC. + NEUROTENSINA

Comparación entre los valores de enteroglucagón post-sobrecarga:

R8 – 30K post-sobrecarga de glucosa			
Grupo	CONTROL	RESECCIÓN	RESEC. + NEUROTENSINA
Media	2013,18	1199,00	379,10
D.E.	1338,41	1045,69	764,81
E.E.M.	403,55	301,86	241,86

RESECCIÓN		
RESEC. + NEUROTENSINA	p = 0,053	
CONTROL	N.S. (p = 0,1)	p < 0,005
	RESECCIÓN	RESEC. + NEUROTENSINA

Comparación entre los valores de los incrementos de enteroglucagón:

INCREMENTO R8 - INCREMENTO 30K			
Grupo	CONTROL	RESECCIÓN	RESEC. + NEUROTENSINA
Media	1309,91	575,30	336,29
D.E.	1125,36	1103,59	777,00
E.E.M.	339,31	318,58	293,68

RESECCIÓN		
RESEC. + NEUROTENSINA	N.S. (p = 0,1)	p = 0,06
CONTROL	N.S. (p = 0,3)	
	RESECCIÓN	
		RESEC. + NEUROTENSINA

Los únicos resultados con significación estadística hacen referencia al aumento de niveles de GLI después de realizar una sobrecarga de glucosa.

Los valores de enteroglucagón son sólo estadísticamente significativos cuando se compara el grupo control con el grupo de resección de colon más tratamiento postoperatorio con neurotensina, tanto en las determinaciones basales como en las determinaciones post-sobrecarga de glucosa.

5. DISCUSIÓN.

El estudio de las funciones del colon ha recibido menor atención, con gran diferencia, que el de las del estómago o intestino delgado. La definición de sus mecanismos fisiológicos es aún incompleta y no se han podido desarrollar pruebas clínicas para su valoración. A la falta de información contribuyen las variaciones estructurales y funcionales de una especie a otra, la compleja microbiología colónica y las diferentes tareas asignadas a cada región dentro de un mismo colon, que dificultan la evaluación fisiológica de este órgano (139).

Los trabajos dirigidos al estudio de la longitud mínima de intestino delgado necesaria para mantener sus funciones han sido numerosos, pero no se ha concedido la misma importancia al colon.

Por el contrario, sí se han realizado investigaciones sobre la respuesta de adaptación del colon a la resección de intestino delgado y se ha demostrado el desarrollo progresivo de una hiperplasia, que es máxima a las dos semanas de la extirpación (111). También se ha examinado la participación del colon en la regulación de la respuesta adaptativa del intestino delgado a la resección parcial o masiva de éste y se ha comprobado que los cambios en la morfología de la mucosa cólica están mediados por el AMPc y tienen por objeto incrementar la absorción (114).

Sin embargo, la relación entre resección de colon y trofismo intestinal no ha sido aún, en sí misma, investigada; tampoco lo ha sido la respuesta adaptativa del intestino a la colectomía.

Aunque Williamson demostró una mayor aparición de tumores de intestino en ratas a las que había practicado una colectomía, debido a una mayor proliferación celular que en las ratas normales (140), la resección de colon ha sido poco estudiada, quizá porque la experiencia en clínica humana demuestra que se puede vivir –sin graves trastornos– tras su extirpación completa.

No obstante, la supresión del intestino grueso no debe ser considerada una intervención sin graves consecuencias.

Se ha demostrado la existencia de una gran población de células endocrinas distribuidas ampliamente por todo el colon. Estas células contienen gránulos secretores y, en el hombre, su examen ultraestructural ha permitido clasificarlas como: **células EC**, almacén de serotonina; **células L**, con inmuno–reactividad de tipo glucagón; **células N**, depósito de neurotensina; **células D**, con somatostatina; otras células, semejantes a las L, podrían contener polipéptido pancreático; además de otras con misiones aún desconocidas (141).¹

Así pues, el colon es asiento de numerosos péptidos cuyas funciones digestivas conocidas son de gran importancia. Entre estos péptidos destaca la presencia de enteroglucagón, hormona cuya participación en los procesos de trofismo intestinal ha sido establecida.

A pesar de ello no hay trabajos recientes que se interesen por la participación el colon en la regulación de la respuesta trófica intestinal tras la resección cólica.

¹ Se puede encontrar una revisión de la clasificación de Wiesbaden para células endocrinas gastrointestinales en el trabajo de Pearse (142).

Nuestra investigación demuestra que la presencia del colon es de importancia capital para las funciones digestivas. **Al extirpar la mayor parte del colon se produce una hiperplasia compensadora en el yeyuno, íleon y colon restante**, que tiene por objeto compensar la pérdida de la absorción cólica causada por la colectomía.

En cualquier estudio experimental sobre el colon hay que tener en cuenta las características del animal de experimentación puesto que hay grandes diferencias entre las especies.

Los herbívoros de estómagos simples poseen grandes intestinos posteriores que permiten la retención de nutrientes para que las enzimas bacterianas tengan tiempo de degradar la celulosa y carbohidratos complejos, que son la base de su dieta. Los rumiantes, herbívoros de estómago complejo y grande, utilizan la digestión bacteriana en el intestino anterior y no precisan un colon voluminoso. Los carnívoros y omnívoros tienen, por lo común, el estómago, ciego y colon de pequeño tamaño, ya que no necesitan degradar la celulosa para obtener su energía.

En nuestro trabajo hemos utilizado la rata debido a su bajo coste, fácil manejo, alta resistencia a las enfermedades y porque, en la literatura dedicada al tema, se ha comprobado su validez como modelo experimental en los estudios de trofismo intestinal.

La rata es el animal que más se emplea dado que ofrece una estructura anatómica similar a la del hombre, si bien el ciego es algo mayor y de superior eficacia funcional. Las únicas diferencias estriban en un tránsito más rápido y en una menor capacidad de

utilización de la fibra, en la rata con respecto al hombre (143); pero ninguno de estas discrepancias la invalida para nuestro estudio.

Al igual que en el humano, el segmento más importante comprende el ciego, colon ascendente y transversal, que son metabólicamente activos; el colon distal representa poco más que un conducto para la excreción de las heces. Por este motivo nos limitamos a la resección del setenta y cinco por cien proximal de la longitud total, que se corresponde con el tramo más eficaz del colon desde el punto de vista de las funciones de absorción, digestión y secreción (139).

En el estudio de Williamson (140), realizado en ratas, se determinó el estímulo carcinogénico de la resección de colon. Después de extirpar el colon derecho o el izquierdo y de suministrar azoximetano se observó que con la colectomía izquierda se produjeron menos tumores en el resto de intestino grueso que con la colectomía derecha. La resección de colon derecho causó el doble de tumores en el intestino grueso distal. Estos resultados demuestran que el colon derecho tiene una función mucho más importante que el distal ya que su extirpación produce un mayor estímulo compensador en el colon restante. Por tanto no creemos necesario practicar una colectomía total para estudiar los efectos de la resección del colon sobre el intestino delgado; es suficiente limitarse a la colectomía derecha.

Cuando nos planteamos el momento apropiado para concluir la experiencia –toma de muestras y sacrificio del animal– decidimos realizarlo en el décimocuarto día de postoperatorio, como la mayoría de los autores.

En el trabajo de Hanson se demostró que la hiperplasia de adaptación se mantenía estable a partir del duodécimo día de postoperatorio y hasta las cuatro semanas (100). A partir de esa publicación casi todos los autores realizan la toma de muestras en el décimo cuarto día (51, 121, 129, 144, 145).

La literatura recoge numerosos métodos de estudio para determinar la existencia de una respuesta trófica y tratar de cuantificarla. Todos ellos se proponen demostrar, directa o indirectamente, si algún agente es capaz de estimular la proliferación celular, pero no todos pueden ser considerados igualmente válidos.

En los primeros trabajos se recurrió a determinaciones elementales y el **peso del animal** fue utilizado para comprobar si la presencia de un posible agente estimulante de la proliferación se correspondía con un aumento del peso. En la actualidad, muchos autores determinan aún este parámetro, imprescindible para los estudios de factores de crecimiento (51).

Los animales de nuestro estudio fueron pesados antes de la intervención y en el momento de la toma de muestras.

Obtuvimos un resultado de interés. La pérdida de peso desde el día de la intervención quirúrgica hasta el día de la toma de muestras, catorce días después, fue significativamente menor en el grupo de animales sometidos a tratamiento con neurotensina.

Ignoramos si las ratas comieron más cantidades por una posible acción de la hormona, que podría ser causante de hiperfagia, o la absorción de nutrientes estuvo aumentada por la acción directa de la neurotensina.

Como **la neurotensina evitó la pérdida de peso secundaria a la resección cólica** sugerimos que se tenga en cuenta este hallazgo en posteriores trabajos de investigación.

Otro de los métodos empleados es la medición del **peso del intestino** restante, en seco o húmedo. La realización de esta técnica es dificultosa y el valor que se le concede a los datos obtenidos es escaso (83). Son muy pocas las publicaciones en las que se hace referencia a la determinación del peso intestinal.

De la misma forma, la **longitud del intestino** restante tampoco ha recibido mucha atención y casi nadie utiliza hoy este dato. En algún trabajo se concedió importancia a la elongación y aumento del diámetro de la circunferencia del intestino (146) y se sugirió que podía haber un crecimiento de todo el tejido adyacente al intestino, pero no se ha podido comprobar (147).

Entre los parámetros más empleados en la literatura destaca la determinación de la **longitud de la vellosidad intestinal**. En los estudios post-resección, las vellosidades son la parte más importante del epitelio para tratar de establecer una correlación entre estructura y función. La masa mucosa intestinal puede incrementarse a expensas de un aumento de la producción celular en la cripta y un retraso de la pérdida en el extremo de la vellosidad (147). La mayor celularidad hace que aumente la longitud y el tamaño de las vellosidades, aunque su número disminuye.

La compleja configuración tridimensional de la mucosa del intestino plantea múltiples problemas para su estudio y la medida del diámetro de la vellosidad o de las criptas exige técnicas de microdisección y proporciona datos no siempre fiables.

Por tanto, hay que recurrir a estimaciones indirectas como las de los **estudios morfométricos**, que han sido el método tradicional empleado para determinar el grado de hiperplasia de la mucosa.

Sin embargo, esta técnica no está exenta de problemas. La manipulación altera la muestra, el menor contacto de la superficie mucosa ocasiona destrucción de vellosidades. La forma de sacrificio del animal puede facilitar la atrofia, especialmente si se mantiene hipovolémico durante la toma de muestras. El retraso en la fijación también puede causar retracción de las vellosidades. Los estudios de morfología de la mucosa intestinal se realizan sobre una sección histológica fijada, habitualmente, en formol; la propia fijación puede alterar la muestra y reducir la longitud de las vellosidades hasta en un diez por cien (148).

A pesar de estos inconvenientes la medición de este parámetro continúa utilizándose ampliamente, al no precisar tecnología compleja. En muchas ocasiones lo que se determina es un índice que relaciona la altura de la vellosidad con la profundidad de la cripta.

En el intestino, la síntesis de RNA y proteína es mayor en las células en proliferación que en el resto de las células, y la producción celular de RNA y proteína contribuye a la síntesis de DNA. La **determinación de ácidos nucleicos** puede informarnos sobre el momento biológico en el que se encuentra un tejido –estático, en crecimiento o en división– y también nos indica el grado de hipertrofia o hiperplasia existentes. La determinación de la concentración de proteína en un homogeneizado del segmento intestinal en estudio, así como la concentración de DNA, son valores cuyo mecanismo de obtención está bien descrito (83).

Una medida indirecta de la respuesta del intestino a una resección es el estudio del **contenido de DNA en la mucosa**. La determinación de la cantidad de DNA existente en

la mucosa intestinal exige obtener una muestra de mucosa libre de otros tejidos que no intervienen en la respuesta de adaptación. Para ello se ha desarrollado la técnica del raspado de la mucosa (88). Sin embargo, con el raspado de mucosa se incluyen cantidades considerables de DNA procedente de las células linfoides de la *lamina propria* y nos obligaríamos a presuponer que estas cantidades no varían entre los diferentes grupos del experimento. Este parámetro es esencial y muy utilizado en los estudios de adaptación (109).

El investigador quiere saber si una determinada maniobra clínica o experimental estimula o frena la proliferación celular. El simple **recuento de mitosis** nos proporciona una información que se puede utilizar como dato comparativo. La duración del ciclo celular, la cantidad de células en proliferación y el número de células por unidad proliferativa –en el intestino es la cripta– nos informan sobre la **tasa de producción celular**.

La **incorporación de timidina tritiada al DNA** es una medida indirecta de la síntesis del DNA y ha sido ampliamente utilizada, tanto para valorar la actividad específica del DNA (111), como en estudios de regeneración de mucosa tras isquemia (148). Algunos autores la han expresado como actividad específica del DNA extraído y otros lo hacen por mg. de peso húmedo o por mg. de proteína (149). También en esta técnica existe alguna posibilidad de error, pues se tiene que asumir que no hay cambios en la actividad de la timidín-kinasa o la timidín-sintetasa o en la captación y transporte del precursor a través de la membrana celular (150). Se trata de un método de autorradiografía que exige exposición a material radio-activo, es caro y requiere instalaciones especiales.

En otros trabajos se han empleado células marcadas para medir la **tasa de migración y diferenciación celular** desde el fondo de la cripta hasta la punta de la vellosidad, pero

no puede usarse como único parámetro comparativo entre dos grupos porque habría que asumir una homogeneidad de las vellosidades en ambos.

Las experiencias de Hanson revelaron un aumento del número de células precursoras y un cambio hacia las características proliferativas en respuesta a la resección (151). Por este motivo lo más atractivo es la determinación de la tasa de producción de nuevas células. Wright aconseja el conteo de metafases, utilizando vincristina para inducir la detención del proceso celular en las metafases. Según este autor, sería ideal la medida de la **tasa de producción celular en la cripta** contando el número de células producidas por cripta y por hora mediante una combinación de la técnica de detención en metafase con la de microdissección (150).

Los estudios de cinética en la mucosa han sido realizados fundamentalmente mediante técnicas radioisotópicas *in vitro*, pero los trabajos *in vivo* han sido menos desarrollados por las limitaciones éticas y metodológicas. Recientemente se ha utilizado la **bromodeoxiuridina** (*5-bromo-2'-deoxyuridine*, BrdUrd). Su uso sería el parámetro ideal para determinar exclusivamente las células en fase S, pero tiene el inconveniente de exigir la inyección de BrdUrd dos o más horas antes de la toma de la muestra. Sin embargo, parece no ser tóxica y ya ha sido utilizada en clínica humana (152).

Aunque se trata de un método poco valorado en la literatura realizamos un **recuento de mitosis** en los tres grupos de estudio. Las preparaciones se tiñeron con **hematoxilina-eosina** y se obtuvieron incrementos en la proliferación en todos los grupos, pero las diferencias no fueron significativas en algunos de ellos.

En la comparación entre el grupo control y el grupo de animales resecados sólo en el íleon se halló una diferencia con significación estadística ($p < 0,001$). En el yeyuno y colon hubo mayor número de mitosis, pero en la comparación estadística de los datos no se consiguieron diferencias significativas.

La comparación entre el grupo control y el grupo de ratas sometidas a resección y tratamiento con neurotensina estableció diferencias significativas en todos los tramos estudiados –yeyuno ($p < 0,001$), íleon ($p < 0,01$) y colon ($p < 0,05$).

Cuando comparamos el grupo de resección y el grupo de resección más tratamiento con neurotensina las diferencias fueron sólo significativas en el yeyuno ($p < 0,01$), pero no en el íleon y colon.

No debemos malinterpretar los resultados del recuento de mitosis en preparaciones teñidas con hematoxilina-eosina. Existe un mayor índice de mitosis en el grupo de resección que en el grupo control. El índice es también mayor en el grupo de resección y tratamiento con neurotensina que en el grupo de resección sin tratamiento postoperatorio. Sin embargo, las diferencias no son estadísticamente significativas en casi ningún tramo digestivo.

A partir de estos datos podríamos pensar que no hay conclusiones válidas en nuestro estudio, ya que no habría argumento estadístico –salvo en el íleon– a favor de un estímulo de la proliferación celular después de realizar una resección del setenta y cinco por cien de colon. Tampoco lo habría –salvo en el yeyuno– para el efecto estimulante de la neurotensina.

Debemos recordar que el método del recuento de mitosis en preparaciones de hematoxilina-eosina es menos fiable que los otros citados para el estudio de la proliferación celular. Solamente permite apreciar la última fase del ciclo celular –la división–

y los resultados no tienen más valor que el de una mera aproximación al fenómeno de la proliferación.

De cualquier manera, se observa un aumento de las mitosis en los grupos de resección y resección más neurotensina, que llega a ser significativo en el íleon –tras la resección– y en el yeyuno –después de administrar neurotensina.

En nuestro estudio decidimos utilizar el **ANTÍGENO NUCLEAR DE PROLIFERACIÓN CELULAR (PCNA)** como técnica fundamental para el conocimiento de la respuesta hiperplásica de adaptación.

El PCNA, también llamado proteína delta–asociada a la DNA–polimerasa, es una proteína nuclear presente en el compartimento proliferativo de todos los tejidos normales, esencial para la replicación del DNA. Fue descubierto por Miyachi a partir de la observación de la actividad de auto–anticuerpos en pacientes con lupus eritematoso (153, 154).

La efectividad de la técnica del PCNA en el estudio de la proliferación celular ha sido equiparada a la de la BrdUrd (155) y ofrece alguna ventaja sobre ésta porque no es invasivo, no es tóxico y no requiere técnicas isotópicas. Se trata de una determinación específica de fase S, pero se pueden plantear dificultades de interpretación porque algunas células en fase G₂, M y G₁ pueden presentar restos del antígeno y teñirse débilmente. Cuando la técnica de inmunocitoquímica (156) no se ha desarrollado correctamente se corre el riesgo de obtener una escala de colores sin grandes diferencias, dificultándose así el recuento de núcleos.

La aplicación del PCNA al estudio del epitelio intestinal es una aportación reciente y se piensa que puede sustituir a los estudios de incorporación de timidina tritiada tras autoradiografía (155). No tenemos conocimiento de que se haya utilizado en la investigación sobre trofismo intestinal hasta el presente trabajo.

Nuestros resultados no pueden ser más satisfactorios. Se ha obtenido una alta significación estadística en todos los grupos comparados ($p < 0,0001$). Según los datos obtenidos con la técnica del PCNA podemos afirmar que **la resección de colon estimula la proliferación celular en la mucosa del intestino delgado y en la del intestino grueso restante**. La proliferación celular fue mayor en el yeyuno, íleon y colon del grupo sometido a resección intestinal que en los mismos tramos del grupo control.

Al comparar el grupo de resección del setenta y cinco por cien de colon con el grupo de resección equivalente de colon y administración de neurotensina en el postoperatorio obtuvimos, nuevamente, diferencias altamente significativas ($p < 0,0001$) en todos los grupos. La proliferación celular apreciada en yeyuno, íleon y colon tras resección de colon se ve potenciada con el tratamiento postoperatorio de neurotensina. Nuestros resultados confirman que la neurotensina estimula el trofismo intestinal.

Así pues, **la neurotensina es un potente estimulante de la proliferación celular en ratas sometidas a resección de colon**, pero habría que estudiar si se trata sólo de un efecto de potenciación del estímulo que supone la resección por sí misma o es capaz de potenciar la proliferación en ratas normales.

En nuestro estudio experimental pretendimos establecer la relación entre la respuesta de adaptación y los **niveles plasmáticos de enteroglucagón**.

En la literatura, el enteroglucagón se ha relacionado ampliamente con el trofismo intestinal.

El descubrimiento de hiperplasia de las vellosidades intestinales en un paciente portador de un tumor renal secretante de enteroglucagón (56) hizo surgir un interés por esta hormona. Se realizaron trabajos experimentales que demostraron niveles elevados de enteroglucagón tras resección intestinal (157). Estos niveles presentaban una correlación con el ritmo de producción celular en la cripta (64). Sin embargo, Buchan observó que las células L, células inmuno-reactivas a enteroglucagón, no tenían la misma respuesta hiperplásica que los enterocitos a una resección intestinal masiva (65). De esta observación se deduce que o bien este proceso requiere más tiempo para aparecer en las células L, o bien estas células no se ven afectadas por los estímulos que causan hiperplasia en los enterocitos.

En el hombre se había observado un incremento selectivo del enteroglucagón tras resección intestinal parcial (158) y se sugirió su papel trófico. Algunos autores han puesto en duda ese papel del enteroglucagón (159, 160), al encontrar estados hipertróficos no asociados a esta hormona, que había sido neutralizada con anticuerpos anti-enteroglucagón (159). Otros han negado esa acción trófica y llegan, incluso, a hablar de un efecto antitrófico (147, 161).

Estudios experimentales recientes no han conseguido demostrar una correlación entre el trofismo intestinal y los niveles de enteroglucagón (162, 163). Mediante técnicas de histomorfometría de las vellosidades intestinales y medición del contenido de DNA en la mucosa, tras resección de intestino delgado, se objetivó una respuesta trófica, sin lograr

una elevación en los niveles de enteroglucagón, quizá por la pérdida de la región intestinal de mayor producción.

Para algunos, el enteroglucagón es la hormona trófica intestinal por excelencia o enterotrofina (66), pero podría no ser el único agente estimulante de la hiperplasia adaptativa y esto justificaría que en algunos estudios no se hayan conseguido resultados a favor de esta acción. Como aún no se dispone de enteroglucagón sintético no se puede lograr la evidencia directa de su participación en el estímulo de la proliferación celular intestinal. Sin embargo, son muchos los autores que aceptan el papel trófico de esta hormona (52, 56, 62, 64, 66, 68, 106, 164). Por tanto, podemos admitir que el enteroglucagón es un activador de la respuesta de adaptación.

En algún trabajo se ha indicado que la liberación del enteroglucagón tras una resección intestinal está determinada por la exposición del intestino restante a concentraciones elevadas de carbohidratos y triglicéridos. La llegada de ácidos grasos de cadena larga al íleon y colon provocaría enlentecimiento del tránsito intestinal y estimularía la proliferación celular para aumentar la absorción (62).

Sin embargo, parece que la glucosa es capaz de estimular una respuesta que se traduce en incremento de GLI y se piensa que este aumento está en relación con la propia glucosa, sin depender de su concentración (165).

La determinación de niveles de enteroglucagón en el plasma plantea problemas técnicos porque el glucagón pancreático y el conocido como enteroglucagón derivan de la misma molécula precursora. Se trata de un pre-pro-glucagón de 180 amino-ácidos que

contiene varios péptidos: polipéptido pancreático relacionado con glicentina (PPRG), glucagón, oxintomodulina y péptidos glucagonoides (GLP 1 y 2, *glucagon-like peptides*) (164).

Al igual que otras prohormonas, el proglucagón puede distribuir sus péptidos derivados por el organismo. Se han evidenciado en el tracto gastrointestinal, páncreas y sistema nervioso central. Los péptidos derivados del proglucagón que se originan en el intestino se conocen como enteroglucagones y sus concentraciones plasmáticas aumentan tras la ingesta oral de grasa o glucosa lo que demuestra un mecanismo de regulación independiente del glucagón pancreático (165).

Se han purificado dos polipéptidos procedentes del intestino del cerdo –glicentina y oxintomodulina– que contienen la secuencia completa del glucagón pancreático y éste, a su vez, contiene el fragmento amino terminal de la glicentina (166).

Las células L intestinales convierten el proglucagón en enteroglucagón y GLP 1 y 2. Los GLP ejercen acciones sobre la insulina, estimulando su liberación (167). El entero-glucagón dirige su acción a la mucosa intestinal. Tiene 69 amino-ácidos, comprende la secuencia del PPRG y la del glucagón; puede dividirse para formar el PPRG (de 30 amino-ácidos) y el proglucagón 33–69 (de 37 amino-ácidos), conocido como oxintomodulina, que es su fracción terminal (168).

Los sueros antiglucagón se desarrollaron a partir de inmunizaciones con glucagón porcino y presentan variaciones dependiendo de los lugares antigénicos que estos antisueros reconocen. Se han caracterizado dos antisueros principales: uno reacciona con la zona carboxi-terminal de la molécula del glucagón y el otro con la parte amino-terminal.

Los C-terminales detectan glucagón pancreático y parecerían específicos, pero pueden reaccionar con otros péptidos presentes en páncreas, tracto digestivo o plasma. Se ha propuesto que los péptidos reconocidos por estos anticuerpos COOH-terminales se denominen glucagones inmuno-reactivos, **IRG** (*immunoreactive glucagon*), y los polipéptidos que reaccionan con los anticuerpos NH₂-terminales se designen como inmuno-reactantes glucagonoides, **GLI** (*glucagon-like immunoreactants*) (169).

En el hombre, utilizando un suero antiglucagón específico para la zona COOH-terminal, el 30K, se obtienen cuatro componentes IRG: un macroglucagón de más de 20.000 daltons de peso molecular que representa la mayor parte de los IRG, un segundo componente de 9.000 daltons y una tercera fracción de 3.500 daltons –ésta es el glucagón verdadero– representan la minoría de los IRG, y el último componente, de 2.000 daltons, puede suponer un treinta y tres por cien de los IRG. La ingesta de glucosa no altera de un modo significativo los valores basales. En la rata, los IRG³⁵⁰⁰ son la fracción predominante (169).

Con el suero antiglucagón específico para la región NH₂-terminal (R8) se detectan otros cuatro picos de inmuno-reactividad, en las mismas regiones y con pesos moleculares similares que con el antisuero 30K. La glucosa, por vía oral, aumenta significativamente la fracción II –GLI⁹⁰⁰⁰– sin alterar las otras (169).

Aunque no se puede determinar con exactitud la cifra real de glucagón plasmático, en estudios sobre el páncreas es suficiente la técnica de radioinmunoensayo con el anticuerpo 30K (170), pero si pretendemos conseguir información sobre el enteroglucagón en el plasma debemos hallar la diferencia entre los IRG –valores obtenidos con el anticuerpo 30K– y los GLI –logrados con el R8. La diferencia más importante de los valores

30K y R8 se obtiene durante la absorción de glucosa en el intestino y se debe a los péptidos GLI intestinales liberados (171).

Por este motivo en nuestro trabajo se calculan los valores basales y tras sobrecarga de glucosa.

Los resultados de enteroglucagón obtenidos revelan que es en el grupo control en donde se encuentran los niveles más elevados, tanto en las determinaciones basales, como en las determinaciones post-sobrecarga de glucosa.

No es una sorpresa puesto que el colon es un gran productor de enteroglucagón y al suprimir este órgano sólo queda la producción ileal. Aunque esta producción estuviese estimulada, parece lógico que no consiga superar los niveles de las ratas no operadas.

La cifra de enteroglucagón basal (R8 – 30K) es significativamente mayor que la del grupo de resección más neurotensina ($p > 0,05$).

Del mismo modo, los valores obtenidos con la sobrecarga de glucosa proporcionan un resultado significativo ($p < 0,005$). Los niveles plasmáticos de enteroglucagón se ven reducidos por la administración de neurotensina después de practicar una resección del setenta y cinco por cien del colon.

La **neurotensina** es otra de las hormonas intestinales que atrajo la atención de algunos autores al demostrarse sus propiedades tróficas y su relación con el enteroglucagón.

Carraway aisló la neurotensina en el hipotálamo de los bóvidos (69) y posteriormente se demostró que su secuencia de aminoácidos es idéntica a la humana (71). Dado que puede medirse empleando técnicas de radioinmunoensayo (172) y ha demostrado una relación con el glucagón (173), ha acaparado la atención de los investigadores en estudios de trofismo intestinal (68, 83, 84, 162, 174). La posibilidad de administrarla aumenta el interés para intentar conocer sus acciones.

Los autores que han administrado neurotensina la han utilizado a diferentes dosis (83, 84). Evers (84) demostró que la dosis de 300 $\mu\text{g/kg}$ previene la atrofia causada por una dieta elemental. Dosis menores (100 $\mu\text{g/kg}$) sólo producen un aumento del contenido yeyunal de DNA, pero ningún cambio sobre la mucosa.

Por nuestra parte, como pretendíamos estudiar el efecto trófico de la neurotensina sobre el intestino tras la resección de la mayor parte del colon, elegimos una dieta polimérica para evitar la atrofia que ocasionan las dietas elementales (22, 84). También optamos por las dosis mayores (600 $\mu\text{g/kg/d}$, repartidos en dos dosis) para tratar de obtener el mayor efecto trófico. En nuestro trabajo, con el tratamiento de dos dosis diarias, alcanzamos una dosis total de neurotensina de 7.800 $\mu\text{g/kg}$ en los trece días de postoperatorio. Esta dosis total supera la de Wood (83) y Evers (84) sólo porque en sus estudios sacrifican al animal al sexto y octavo día respectivamente.

La relación de la neurotensina con el glucagón fue estudiada y se observó que la administración parenteral de 2 μ g a ratas produjo hiperglucagonemia y también hiperinsulinemia (77). El efecto parece ser por acción directa sobre los islotes. Usando cultivos celulares de islotes de ratas neonatas se observó que a concentraciones de glucosa de 3 mM, dosis de 10–100 nM de neurotensina tenían un efecto estimulador de vida corta sobre la liberación de glucagón (173).

Un hallazgo interesante de nuestro estudio es la demostración de que la administración de neurotensina a animales sometidos a resección de colon ocasiona una disminución de los niveles de enteroglucagón, con respecto a los del grupo de resección y a los controles.

La reducción de niveles de enteroglucagón tiene dos posibles interpretaciones:

1. Podría ser que la neurotensina ejerciese una acción, directa o indirecta, sobre el enteroglucagón, restringiendo su liberación.
2. La neurotensina es una hormona trófica y, por un mecanismo de retroalimentación, bloquea el estímulo de la liberación de enteroglucagón. Éste no necesita aumentar sus niveles para contribuir al trofismo intestinal porque la neurotensina suple esta acción.

Las técnicas utilizadas para determinar la capacidad trófica del enteroglucagón y la neurotensina, entre otras sustancias, han proporcionado conclusiones a veces contradictorias. Se han observado diferencias en los resultados dependiendo de que los

estudios se hayan realizado *in vitro* o *in vivo* (85). Todavía está por definir un modelo válido para el estudio de la capacidad trófica sobre el tracto gastrointestinal de una sustancia determinada.

Nuestro trabajo parece apoyar claramente la función trófica de la neurotensina tras resección de colon. Sin embargo, no hemos encontrado una correlación entre el trofismo intestinal y los niveles de enteroglucagón. Sería importante cuantificar la producción de esta hormona en íleon y colon para poder dar una interpretación correcta a nuestros resultados.

La investigación profunda de las acciones de la neurotensina nos conducirá a la demostración exacta de su acción trófica. Hasta ahora se conoce que su administración, en las ratas, estimula el trofismo intestinal (83) y que su liberación fisiológica está mediada por el efecto directo de los ácidos grasos sobre las células endocrinas intestinales (175).

En nuestro estudio demostramos la acción estimulante de la neurotensina sobre la proliferación celular y su acción inhibitoria de la liberación de enteroglucagón, cuando se administra, a dosis suprafisiológicas, a ratas sometidas a resección de colon.

Es imprescindible continuar la investigación encaminada al hallazgo del factor o factores que estimulan la respuesta trófica y, una vez alcanzado este objetivo, procurar su aplicación a la clínica humana.

Como el hombre tiene capacidad de adaptación (176) debemos estar en condiciones de potenciarla al máximo tras las resecciones intestinales masivas, para tratar de evitar las graves consecuencias de una nutrición parenteral prolongada, llegar a disminuir la

Discusión

necesidad de trasplantes de intestino y contribuir al éxito de esta técnica mejorando las cualidades de la mucosa intestinal y la viabilidad del implante.

Creemos que debe continuarse el estudio de las acciones de la neurotensina hasta realizar estudios de tolerancia y toxicidad de esta hormona y, posteriormente, si se confirma su inocuidad, llevar a cabo ensayos clínicos administrando neurotensina.

6. CONCLUSIONES.

De los resultados obtenidos en el presente trabajo experimental se pueden deducir las siguientes conclusiones:

1. **La resección del setenta y cinco por cien proximal del colon estimula la proliferación celular en el intestino delgado y grueso restante.** En el yeyuno, íleon y resto de colon se observan incrementos de los índices de proliferación.
2. **La relación entre la respuesta de adaptación a la colectomía y los niveles plasmáticos de enteroglucagón es inversamente proporcional.** La resección del colon aumenta la proliferación en el resto del intestino, pero reduce los niveles plasmáticos de enteroglucagón.
3. **La administración de neurotensina a dosis de 300 microgramos cada doce horas potencia el estímulo de proliferación celular obtenido con la resección de colon.** En todas las regiones del intestino se apreció mayor proliferación tras la administración de neurotensina a las ratas sometidas a colectomía del setenta y cinco por cien.
4. **Se produce una relación inversamente proporcional entre los cambios proliferativos originados por la administración de neurotensina tras colectomía y los niveles plasmáticos de enteroglucagón.** La neurotensina aumenta la proliferación celular tras resección de colon y disminuye los niveles de enteroglucagón.

7. RESUMEN.

Se ha desarrollado un estudio experimental, en ratas, para conocer y valorar la respuesta adaptativa del intestino a la resección del setenta y cinco por cien proximal del colon y las modificaciones tróficas que pudieran producirse por la administración de neurotensina tras la colectomía.

El estudio se ha llevado a cabo dividiendo a los animales en tres grupos de doce ratas cada uno. Grupo control, grupo de resección de colon y grupo de resección más tratamiento postoperatorio con neurotensina durante trece días.

En todos los animales se tomaron muestras de yeyuno, íleon y colon para realizar un recuento de mitosis en preparaciones teñidas con hematoxilina-eosina y un índice de la proliferación celular, mediante una técnica de inmunocitoquímica que emplea el antígeno nuclear de proliferación celular.

Además se realizó a todos los animales una extracción de sangre basal y otra tras sobrecarga de glucosa para determinar niveles plasmáticos de enteroglucagón.

De los resultados obtenidos se deduce que, en cuanto al incremento mitótico, hay diferencias estadísticamente significativas, tanto en yeyuno como en íleon, entre los tres grupos predefinidos, siendo mayor la proliferación celular en el de resección con respecto al de control, y en el de resección más tratamiento con neurotensina con respecto al de resección sin tratamiento postoperatorio. En las muestras de colon los resultados son similares.

Los niveles de enteroglucagón descienden después de la resección y después de la administración de neurotensina. El aumento de la proliferación celular no está en relación, aquí, con el enteroglucagón y es sólo atribuible al estímulo de la propia resección y al de la neurotensina.

8. BIBLIOGRAFÍA.

1. **Dowling RH, Booth CC.** Functional compensation after small-bowel resection in man. *Lancet* 1966;2:146–7.
2. **Devine RM, Kelly KA.** Surgical therapy of the short bowel syndrome. *Gastroenterol Clin North Am* 1989;18:603–18.
3. **Marino PL.** Enteral nutrition. En: *The ICU book*. Marino, ed. Philadelphia, Lea & Febiger 1991:527–43.
4. **Booth CC.** The metabolic effects of intestinal resection in man. *Postgraduate Medical Journal* 1961;37:725–39.
5. **Williamson RCN.** Intestinal adaptation (First of two parts). Structural, functional and cytokinetic changes. *N Eng J Med* 1978; 298:1393–402.
6. **Gillespie IE.** Small intestine. En: Ledingham IM, MacKay C, eds. *Jamieson & Kay, Textbook of Surgical Physiology*, 3^a ed. Edimburgo, Churchill Livingstone, 1978:229–51.
7. **Sprinz H.** Factors influencing intestinal cell renewal: a statement of principles. *Cancer* 1971;28:71–4.
8. **Henning SJ.** Functional development of the gastrointestinal tract. En: Johnson LR, ed. *Physiology of the gastrointestinal tract*, 2^a ed. New York, Raven Press, 1987:285–300.
9. **Steiner M, Bourges HR, Freedman LS, Gray SJ.** Effect of starvation on the tissue composition of the small intestine in the rat. *Am J Physiol* 1968;215:75–7.
10. **Aldewachi HS, Wright NA, Appleton DR, Watson AJ.** The effect of starvation and refeeding on cell population kinetics in the rat small bowel mucosa. *J Anat* 1975;119:105–21.

11. **Goodlad RA, Al-Mukhtar MYT, Ghatel MA, Bloom SR, Wright NA.** The relationship between cell proliferation, plasma enteroglucagon and plasma gastrin levels in starved and re-fed rats. *Scand J Gastroenterol* 1983;18(Supl 82):193.
12. **Altmann GG.** Influence of starvation and refeeding on mucosal size and epithelial renewal in the rat small intestine. *Am J Anat* 1972;133:391–400.
13. **Hopper AF, Rose PM, Wannemacher RW Jr.** Cell population changes in the intestinal mucosa of protein-depleted or starved rats. II. Changes in cellular migration rates. *J Cell Biol* 1972;53:225–30.
14. **Jacobs LR, Bloom SR, Harsoulis P.** Intestinal adaptation in hypothermic hyperphagia. *Clin Sci Med* 1975;48:14–7.
15. **Grey VL, Morin CL.** A growth-stimulating activity derived from the proximal small intestine is associated with an adaptative response. *Can J Physiol Pharmacol* 1990;68:646–9.
16. **Dowling RH.** Small bowel adaptation and its regulation. *Scand J Gastroenterol* 1982;17(supl 74):53–74.
17. **Johnson LR.** Regulation of gastrointestinal growth. En: Johnson LR ed. *Physiology of the gastrointestinal tract*, 2^a ed. New York, Raven Press, 1987:301–34.
18. **Morin CL, Grey VL, Garofalo C.** Influence of lipids on intestinal adaptation after resection. En: Robinson JWL, Dowling RH, Riecken EO, eds. *Falk Symposium 30. Mechanisms of intestinal adaptation*. Lancaster, MTP Press, 1982:175–84.
19. **Koruda MJ, Rolandelli RH, Settle RG, Zimmaro DM, Rombeau JL.** Effect of parenteral nutrition supplemented with short-chain fatty acids on adaptation to massive small bowel resection. *Gastroenterol* 1988;95:715–20.

20. **Go VLW, Miller LJ.** The role of gastrointestinal hormones in the control of postprandial and interdigestive gastrointestinal function. *Scand J Gastroenterol* 1983;18(Supl 82):135-42.
21. **Lo CW, Walker WA.** Changes in gastrointestinal tract during enteral or parenteral feeding. *Nutr Rev* 1989;47:193-8.
22. **Lai HS, Chen WJ, Chen KM, Lee YN.** Effects of monomeric and polimeric diets on small intestine following resection. *Taiwan Hsueh Hui Tsa Chih* 1989;88:982-8.
23. **Green DW, Gomez G, Greeley GH.** Gastrointestinal peptides. *Gastroenterol Clin North Am* 1989;18:695-733.
24. **Thulin L.** Effects of gastrointestinal polypeptides on hepatic bile flow and splanchnic circulation. *Acta Chir Scand* 1973;139(Supl 441):1-31.
25. **Adrian TE, Besterman HS, Mallinson CN, Greenberg GR; Bloom SR.** Inhibition of secretin stimulated pancreatic secretion by pancreatic polypeptide. *Gut* 1979;20:37-40.
26. **Sakamoto T, Newman J, Fujimura M et al.** Role of neurotensin in pancreatic secretion. *Surg* 1984;96:146-53.
27. **Knuhtsen S, Holst JJ, Jensen SL, Knigge U, Nielsen OV.** Gastrin- releasing peptide: Effect on exocrine secretion and release from isolated perfused porcine pancreas. *Am J Physiol* 1985;248:G281-6.
28. **Gardner JD, Jensen RT.** Receptors mediating the actions of secretagogues on pancreatic acinar cells. En: Go VLW, Gardner JD, Brooks FP et al., eds. *The exocrine pancreas: Biology, pathobiology and diseases*. New York, Raven Press, 1986:109-25.
29. **Lluís F, Gómez G, Fujimura M, et al.** Peptide YY inhibits nutrient-, hormonal-, and vagally-stimulated pancreatic exocrine secretion. *Pancreas* 1987;2:454.

30. **Herzig KH, Loui DS, Owyang C.** In vivo action of bombesin on exocrine pancreatic secretion in the rat. Independent of cholecistokinin and cholinergic mediation. *Pancreas* 1988;3:292–8.
31. **Seidel ER, Marcuard S.** Stimulation of ileal mucosal growth by insulin-like growth factor I (IGF-I). *Digestion* 1990;46(S1):103.
32. **Enochs MR, Johnson LR.** Effect of hypophysectomy and growth hormone on serum and antral gastrin levels in the rat. *Gastroenterol* 1976;70:727–32.
33. **Scott J, Batt RM, Maddison YE, Peters TJ.** Differential effect of glucocorticoids on structure and function of adult rat jejunum. *Am J Physiol* 1981;241:G306–12.
34. **Hart MH, Phares CK, Erdman SH, Grandjean CJ, Park JH, Vanderhoof JA.** Augmentation of postresection mucosal hyperplasia by plerocercoid growth factor (PGF). Analog of human growth hormone. *Dig Dis Sci* 1987;32:1275–80.
35. **Bayliss WM, Starling EH.** The mechanism of pancreatic secretion. *J Physiol (London)* 1902;28:325–353.
36. **Bolande RP.** The neurocristopathies: A unifying concept of disease arising in neural crest maldevelopment. *Hum Pathol* 1974;5:409–29.
37. **Koch TR, Go VLW.** Regulatory peptides and the large bowel and hindgut apudomas. En: Kirsner JB, Shorter RG, eds. *Diseases of the colon, rectum, and anal canal*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1988:47–64.
38. **Uvnäs-Moberg K.** Gastrointestinal hormones and pathophysiology of functional gastrointestinal disorders. *Scand J Gastroenterol* 1987;22(Supl 128):138–46.
39. **Bloom SR, Polak JM.** Gut hormones in disease. *Scand J Gastroenterol* 1983;18(Supl 82):1–6.
40. **Walsh JH.** Gastrointestinal hormones. En: Johnson LR, ed. *Physiology of the gastrointestinal tract*. 2^a ed. New York, Raven Press, 1987:181–253.

41. **Johnson LR.** The trophic action of gastrointestinal hormones. *Gastroenterol* 1976;70:278–88.
42. **Johnson LR.** New aspects of the trophic action of gastrointestinal hormones. *Gastroenterol* 1977;72:788–92.
43. **Blom H, Erikoinen T.** Trophic effect of pentagastrin on normal and regenerating parietal cells. A light and electron microscopic study in rats. *Gastroenterol* 1984;87:537–41.
44. **Schwartz MZ, Storozuk RB.** Enhancement of small intestine absorption by intraluminal gastrin. *J Surg Res* 1986;40:421–5.
45. **Simopoulos C, Gaffen JD, Bennett A.** Effects of gastrointestinal hormones on the growth of human intestinal epithelial cells in vitro. *Gut* 1989;30:600–4.
46. **Saffouri B, Weir GC, Bitar KN, Makhoul GM.** Gastrin and somatostatin secretion by perfused rat stomach: Functional linkage of antral peptides. *Am J Physiol* 1980;238:G495–501.
47. **Lehy T, Peranzi G, Cristina ML.** Correlative immunocytochemical and electron microscopic studies: identification of (entero)glucagon–somatostatin–and pancreatic polypeptide–like–containing cells in the human colon. *Histochemistry* 1981;71:67–80.
48. **Saffouri B, DuVal JW, Makhoul GM.** Stimulation of gastrin secretion in vitro by intraluminal chemicals: Regulation by intramural cholinergic and noncholinergic neurons. *Gastroenterol* 1984;87:557–61.
49. **Lehy T, Accary JP, Labeille D, Dubrasquet M.** Chronic administration of bombesin stimulates antral gastrin cell proliferation in the rat. *Gastroenterol* 1983;84:914–9.

50. **Cooke HJ.** Regulation of colonic transport by the autonomic nervous system. En: Phillips SF, Pemberton JH, Shorter RG, eds. The large intestine. Physiology, pathophysiology and disease. New York, Raven Press, 1991:169–79.
51. **Oka Y, Ghishan FK, Greene HL, Orth DN.** Effect of mouse epidermal growth factor/urogastrone on the functional maturation of rat intestine. *Endocrinol* 1983;112:940–44.
52. **Lentze MJ.** Intestinal adaptation in short-bowel syndrome. *Eur J Pediatr* 1989;148:294–9.
53. **Feldman EJ, Aures D, Grossman MI.** Epidermal growth factor stimulates ornithine decarboxylase activity in the digestive tract of mouse. *Proc Soc Exp Biol Med* 1978;159:400–2.
54. **Garthwaite TL.** Peripheral motilin administration stimulates feeding in fasted rats. *Peptides* 1985;6:41–4.
55. **Guerrero JM, Prieto JC, Calvo JR, Goberna R.** Activation of cyclic AMP–dependent protein kinase by VIP in blood mononuclear cells. *Peptides* 1984;5:371–3.
56. **Gleeson MH, Bloom SR, Polak JM, Henry K, Dowling RH.** Endocrine tumor in kidney affecting small bowel structure, motility and absorptive function. *Gut* 1971;12:773–82.
57. **Bloom SR.** An enteroglucagon tumor. *Gut* 1972;13:520–3.
58. **Lefèbvre PJ, Luyckx AS.** Extrapaneatic glucagon and its regulation. En: Lefèbvre PJ, ed. Glucagon (Handbook of experimental pharmacology; v. 66/II). Berlin, Springer–Verlag, 1983;205–19.
59. **Bloom SR.** Gut and brain – endocrine connections. *J R Coll Physicians London* 1980;14:51–7.

60. **Munck A, Kervran A, Marie JC, Bataille D, Rosselin G.** Glucagon-37 (oxyntomodulin) and glucagon-29 (pancreatic glucagon) in human bowel: analysis by HPLC and radioreceptor assay. *Peptides* 1984; 5:553-61.
61. **Goodlad RA, Lenton W, Ghatel MA, Adrian TE, Bloom SR, Wright NA.** Proliferative effects of "fibre" on the intestinal epithelium: relationship to gastrin, enteroglucagon and PYY. *Gut* 1987;28(supl 1):221-6.
62. **Sagor GR, Ghatel MA, Al-Mukhtar MYT, Wright NA, Bloom SR.** Evidence for a humoral mechanism after small intestinal resection: Exclusion of gastrin but not enteroglucagon. *Gastroenterology* 1983;84:902-6.
63. **Polak JM, Ferri GL, Harris A, et al.** Dynamics of the enteroglucagon cell during intestinal adaptation. En: Robinson JWL, Dowling RH, Riecken EO, eds. *Falk Symposium 30. Mechanisms of intestinal adaptation*. Lancaster, MTP Press, 1982: 257-67.
64. **Górnac GE, Al-Mukhtar MYT, Ghatel MA, Sagor GR, Wright NA, Bloom SR.** Pattern of cell proliferation and enteroglucagon response following small bowel resection in the rat. *Digestion* 1984;29:65-72.
65. **Buchan AMJ, Griffiths CJ, Morris JF, Polak JM.** Enteroglucagon cell hyperfunction in rat small intestine after gut resection. *Gastroenterol* 1985;88:8-12.
66. **Appleton GVN, Bristol JB, Williamson RCN.** Proximal enterectomy provides a stronger systemic stimulus to intestinal adaptation than distal enterectomy. *Gut* 1987;28(Supl 1):165-8.
67. **Bloom SR, Polak JM.** Enteroglucagon and the gut hormone profile on intestinal adaptation. En: *Falk Symposium 30. Mechanisms of intestinal adaptation*.

- Robinson JW, Dowling RH, Riecken EO, eds. Lancaster, MTP Press, 1982:189–99.
68. **Watanapa P, Beardshall K, Calam J, Williamson RCN.** Tropic role of enteroglucagon in pancreatic adaptation to subtotal enterectomy. *Br J Surg* 1991;78:917–20.
69. **Carraway R, Leeman SE.** The isolation of a new hypotensive peptide, neurotensin, from bovine hypothalami. *J Biol Chem* 1973;248:6854–61.
70. **Kitabgi P, Carraway R, Leeman SE.** Isolation of a tridecapeptide from bovine intestinal tissue and its partial characterization as neurotensin. *J Biol Chem* 1976;251:7053–8.
71. **Hammer RA, Leeman SE, Carraway R, Williams RH.** Isolation of human intestinal neurotensin. *J Biol Chem* 1980;255:2476–80.
72. **Carraway R, Leeman SE.** Characterization of radioimmunoassayable neurotensin in the rat: Its differential distribution in the central nervous system, small intestine and stomach. *J Biol Chem* 1976;251:7045–52.
73. **Sundler F, Håkanson R, Hammer RA, et al.** Immunohistochemical localization of neurotensin in endocrine cells of the gut. *Cell Tissue Res* 1977;178:313–21.
74. **Sundler F, Alumets J, Håkanson R, Carraway R, Leeman SE.** Ultrastructure of the gut neurotensin cell. *Histochemistry* 1977; 53:25–34.
75. **Schultzberg M, Hökfelt T, Nilsson G, et al.** Distribution of peptide- and catecholamine-containing neurons in the gastro-intestinal tract of rat and guinea-pig: immunohistochemical studies with antisera to substance P, vasoactive intestinal polypeptide, enkephalins, somatostatin, gastrin/cholecystokinin, neurotensin and dopamine β -hydroxylase. *Neuroscience* 1980;5:689–744.

76. **Carraway R, Demers LM, Leeman SE.** Hyperglucemic effect of neurotensin, a hypothalamic peptide. *Endocrinology* 1977;99:1452–62.
77. **Brown M, Vale W.** Effects of neurotensin and substance P on plasma insulin, glucagon and glucose levels. *Endocrinology* 1976;98:819–22.
78. **Calam J, Unwin R, Peart WS.** Neurotensin stimulates defecation. *Lancet* 1983;1:737–8.
79. **Harper SL, Barrowman JA, Kvietys PR, Granger DN.** Effect of neurotensin in intestinal capillary permeability and blood flow. *Am J Physiol* 1984;247:G161–6.
80. **Nemeroff CB, Hernandez DE, Orlando RC, Prange Jr AJ.** Cytoprotective effect of centrally administered neurotensin on stress-induced gastric ulcers. *Am J Physiol* 1982;242:G342–6.
81. **Ferris CF, Carraway R, Hammer RA, Leeman SE.** Release and degradation of neurotensin during perfusion of rat small intestine with lipid. *Regul Peptides* 1985;12:101.
82. **Holst-Pedersen J, Fahrenkrug J.** Neurotensin-like immunoreactivities in human plasma: feeding responses and metabolism. *Peptides* 1986;7:15–20.
83. **Wood JG, Hoang HD, Bussjaeger LJ, Solomon TE.** Neurotensin stimulates growth of small intestine in rats. *Am J Physiol* 1988;255:G813–7.
84. **Evers BM, Mehrabian H, Townsend Jr CM, Uchida T, Thompson JC.** Neurotensin prevents small bowel mucosal atrophy produced by an elemental diet. *Surg Forum* 1989;40:22–4.
85. **Woll PJ, Rozengurt E.** Neuropeptides as growth regulators. *Br Med Bull* 1989;45:492–505.
86. **Grey VL, Morin CL.** Role of food in appearance of growth-stimulating activity in rat proximal intestine after small-bowel resection. *Dig Dis Sci* 1988;33:78–82.

87. **Eastwood GL.** Gastrointestinal epithelial renewal. *Gastroenterol* 1977;72:962–75.
88. **Buchholtz TW, Malamud D, Ross JS, Malt RA.** Onset of cell proliferation in the shortened gut: Growth after subtotal colectomy. *Surgery* 1976;80:601–7.
89. **Jonas A, Flanagan PR, Forstner GG.** Pathogenesis of mucosal injury in the blind loop syndrome: brush border enzyme activity and glycoprotein degradation. *J Clin Invest* 1977;60:1321–30.
90. **Baraona E, Pirola RC, Lieber CS.** Small intestinal damage and changes in cell population produced by ethanol ingestion in the rat. *Gastroenterol* 1974;66:226–34.
91. **Said HM, Tripton W, Nylander W, Urban E.** Effect of small bowel resection on the intestinal surface acid microclimate in the rat. *Digestion* 1987;38:221–5.
92. **Williamson RCN.** Intestinal adaptation (Second of two parts). *Mechanisms of Control. N Eng J Med* 1978;298:1444–50.
93. **Håkanson R, Vallgren S, Ekelund M, Rehfeld JF, Sundler F.** The vagus exerts trophic control of the stomach in the rat. *Gastroenterol* 1984;86:28–32.
94. **Levine GM, Kotler DP, Yezdimir EA.** Luminal nutrition obviates sympathectomy-induced intestinal atrophy in the rat. En: Robinson JWL, Dowling RH, Riecken EO, eds. *Falk Symposium 30. Mechanisms of intestinal adaptation.* Lancaster, MTP Press, 1982:311–7.
95. **Weser E.** Nutritional aspects of malabsorption: Short gut adaptation. *Clinics Gastroenterol* 1983;12:443–61.
96. **Williamson RCN.** Intestinal adaptation: Factors that influence morphology. *Scand J Gastroenterol* 1982;17(Supl 74):21–9.

97. **Genyk SN.** Ultrastructure of the apical part of the epithelial cells of the mucous membrane of the small intestine after extensive experimental enterectomy. *Bull Exp Biol Med* 1971;72:964–67.
98. **Tilson MD, Wright HK.** The effect of resection of the small intestine upon the fine structure of the intestinal epithelium. *Surg Gynecol Obstet* 1972;134:992–4.
99. **Grönqvist B, Engström B, Grimelius L.** Morphological studies of the rat small intestine after jejun–ileal transposition. *Acta Chir Scand* 1975;141:208–17.
100. **Hanson WR, Osborne JW, Sharp JG.** Compensation by the residual intestine after intestinal resection in the rat. II. Influence of postoperative time interval. *Gastroenterol* 1977;72:701–5.
101. **Hanson WR, Osborne JW.** Epithelial cell kinetics in the small intestine of the rat 60 days after resection of 70 per cent of the ileum and jejunum. *Gastroenterol* 1971;60:1087–97.
102. **McDermott FT, Roudnew B.** Ileal crypt cell population kinetics after 40 % small bowel resection: autoradiographic studies in the rat. *Gastroenterol* 1976;70:707–11.
103. **Hanson WR, Osborne JW, Sharp JG.** Compensation by the residual intestine after intestinal resection in the rat. I. Influence of amount of tissue removed. *Gastroenterol* 1977;72:692–700.
104. **Weser E, Hernández MH.** Studies of small bowel adaptation after intestinal resection in the rat. *Gastroenterol* 1971;60:69–75.
105. **Bury KD.** Carbohydrate digestion and absorption after massive resection of the small intestine. *Surg Gynecol Obstet* 1972;135: 177–87.
106. **Allard JP, Jeejeebhoy KN.** Nutritional support and therapy in the short bowel syndrome. *Gastroenterol Clin North Am* 1989;18:589–601.

107. **Gleeson MH, Cullen J, Dowling RH.** Intestinal structure and function after small bowel by-pass in the rat. *Clin Sci* 1972;43:731–42.
108. **Fenyö G, Hallberg D.** Intestinal hypertrophy after small intestinal bypass in the rat. Studies on methods and reversibility of changes. *Acta Chir Scand* 1976;142:261–9.
109. **Williamson RCN, Bauer FLR, Ross JS, Malt RA.** Proximal enterectomy stimulates distal hyperplasia more than bypass or pancreatobiliary diversion. *Gastroenterol* 1978;74:16–23.
110. **Tilson MD, Michaud JT, Livstone EM.** Early proliferative activity in the left colon of the rat after partial small-bowel resection. *Surg Forum* 1976;27:445–6.
111. **Nundy S, Malamud D, Obertop H, Sczerban J, Malt RA.** Onset of proliferation in the shortened gut: colonic hyperplasia after ileal resection. *Gastroenterol* 1977;72:263–6.
112. **Williamson RCN, Bauer FLR, Malt RA.** Enhancement of chemically induced neoplasia by proximal enterectomy. *Br J Cancer* 1977;36:401.
113. **Tamames S, De Vega D, Furio V, Tamames S.** Estudio ultraestructural del colon tras la resección intestinal masiva en ratas. *Rev Esp Enf Ap Dig* 1989;75:7–13.
114. **Vázquez CM, Molina MT, Ilundain A.** Role of rat large intestine in reducing diarrhea after 50% or 80% distal small bowel resection. *Dig Dis Sci* 1989; 34:1713–9.
115. **Dowling RH, Booth CC.** Structural and functional changes following small intestinal resection in the rat. *Clin Sci* 1967;32:139–49.
116. **Wright HK, Poskitt T, Cleveland JC, Herskovic T.** Effect of colon resection on morphology and absorptive capacity of ileum in the rat. *Gastroenterol* 1968;54:1285.

117. **Robert A.** An intestinal disease produced experimentally by a prostaglandin deficiency. *Gastroenterol* 1975;69:1045–47.
118. **Pawlikowski M.** Are prostaglandins involved in the mitogenic actions of hormones? *Exp Clin Endocrinol* 1983;81:233–8.
119. **Whittle BJR, Vane JR.** Prostanoids as regulators of gastrointestinal function. En: Johnson LR, ed. *Physiology of the gastrointestinal tract*. 2^a ed. New York, Raven Press, 1987:143–80.
120. **Strickland RG.** The mechanisms of colonic defense. Clinical implications. En: Kirsner JB, Shorter RB, eds. *Diseases of the colon, rectum, and anal canal*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1988: 157–64.
121. **Vanderhoof JA, Grandjean CJ, Baylor JM, Baily J, Euler AR.** Morphological and functional effects of 16,16–dimethyl–prostaglandin–E2 on mucosal adaptation after massive distal small bowel resection in the rat. *Gut* 1988;29:802–8.
122. **Pegg AE, McCann PP.** Polyamine metabolism and function. *Am J Physiol* 1982; 243:C212–21.
123. **Yang P, Bayling SB, Luk GD.** Polyamines and intestinal growth: Absolute requirement for ODC activity in adaptation during lactation. *Am J Physiol* 1984; 247:G553–7.
124. **Luk GD, Baylin SB.** Polyamines and intestinal growth–increased polyamine biosynthesis after yeyunectomy. *Am J Physiol* 1983;245: G656–60.
125. **Debas HT.** The colon as an endocrine organ. *Dig Dis Sci* 1981;26: 193–4.
126. **Seal AM, Debas HT.** Colonic inhibition of gastric acid secretion in the dog. *Gastroenterol* 1980;79:823–6.
127. **Jian R, Besterman HS, Sarson DL, et al.** Colonic inhibition of gastric secretion in man. *Dig Dis Sci* 1981;26:195–201.

128. **Owyang C, Green L, Rader D.** Colonic inhibition of pancreatic and biliary secretion. *Gastroenterol* 1983;84:470–5.
129. **Miazza BM, Al-Mukhtar MYT, Salmeron M, et al.** Hyperentero–glucagonaemia and small intestinal mucosal growth after colonic perfusion of glucose in rats. *Gut* 1985;26:518–24.
130. **Bloom SR, Bryant MG, Polak JM.** Distribution of gut hormones. *Gut* 1975; 16:821.
131. **Hawker PC, Turnberg LA.** Fluid and electrolyte transport in the colon. En: Alexander–Williams J, Binder HJ, eds. *Large Intestine*. London, Butterworths, 1983:1–15.
132. **Ekblab E, Ekman R, Håkanson R, Sundler F.** Projections of peptide–containing neurons in rat colon. *Neuroscience* 1988;27:655–74.
133. **Huizinga JD, Daniel EE.** Motor functions of the colon. En: Phillips SF, Pemberton JH, Shorter RG, eds. *The large intestine. Physiology, pathophysiology and disease*. New York, Raven Press, 1991:93–114.
134. **Landor JH, Alcancia EY, Fulkerson CC.** Effect of colectomy on gastric secretion in dogs. *Am J Surg* 1967;113:32–6.
135. **Wright HK, Cleveland JC, Tilson MD, Herskovic T.** Morphology and absorptive capacity of the ileum after ileostomy in man. *Am J Surg* 1969;117:242–5.
136. **Hill GL, Mair WSJ, Goligher JC.** Impairment of "ileostomy adaptation" in patients after ileal resection. *Gut* 1974;15:982–7.
137. **Kennedy HJ, Al-Dujaili EAS, Edwards CRW, Truelove SC.** Water and electrolyte balance in subjects with a permanent ileostomy. *Gut* 1983;24:702–5.

138. **Hernández-Bermejo JP, Amerigo J, Rodríguez J, Vargas J.** Participación del colon en el proceso de adaptación compensadora tras la resección intestinal masiva. Estudio experimental en ratas. *Cir Pediatr* 1991;4:140-3.
139. **Phillips SF.** Physiology and pathophysiology of the large intestine and anal canal. En: Kirsner JB, Shorter RG, eds. *Diseases of the colon, rectum, and anal canal*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1988:23-46.
140. **Williamson RCN, Davies PW, Bristol JB, Wells M.** Intestinal adaptation and experimental carcinogenesis after partial colectomy. *Gut* 1982;23:316-25.
141. **Buffa R, Capella C, Fontana P, Usellini L, Solcia E.** Types of endocrine cells in the human colon and rectum. *Cell Tissue Res* 1978;192:227-40.
142. **Pearse AGE, Polak JM, Bloom SR.** The newer gut hormones: Cellular sources, physiology, pathology, and clinical aspects. *Gastroenterology* 1977;72:746-61.
143. **McBurney MI, Van Soest PJ.** Structure-function relationships. Lessons from other species. En: Phillips SF, Pemberton JH, Shorter RG, eds. *The large intestine: Physiology, pathophysiology and disease*. New York, Raven Press, 1991:37-50.
144. **Feurle GE, Müller B, Rix E.** Neurotensin induces hyperplasia of the pancreas and growth of the gastric antrum in rats. *Gut* 1987;28(Supl 1):19-23.
145. **De Castro J, Armengol M, Oller B, Catalá E, Escudero I, Salva JA.** Mecanismos de adaptación al intestino corto. Influencia del factor biliopancreático: estudio experimental. *Rev Esp Enf Dig* 1991;79:381-5.
146. **Sachdev R, Ackerman NB.** Comparison of changes in intestinal length and circumference after 90 per cent bypass and 90 per cent resection. *Am J Surg* 1979;137:208-12.

147. **Riecken EO, Stallmch A, Zeitz M, Schulzke JD, Menge H, Gregor M.** Growth and transformation of the small intestinal mucosa – importance of connective tissue, gut associated lymphoid tissue and gastrointestinal regulatory peptides. *Gut* 1989;30:1630–40.
148. **Harris MS, Kennedy JG, Siegesmund KA, Yorde DE.** Relationship between distention and absorption in rat intestine. I. Effect of luminal volume on the morphology of the absorbing surface. *Gastroenterol* 1988;94:1164–71.
148. **Park PO, Haglund U.** Regeneration of small bowel mucosa after intestinal ischemia. *Crit Care Med* 1992;20:135–9.
149. **Ryan GP, Dudrick SJ, Copeland EM, Johnson LR.** Effects of various diets on colonic growth in rats. *Gastroenterol* 1979;27:658–63.
150. **Wright NA.** The experimental analysis of changes in proliferative and morphological status in studies on the intestine. *Scand J Gastroenterol* 1982;17(supl 74):3–10.
151. **Hanson WR.** Proliferative and morphological adaptation of the intestine to experimental resection. *Scand J Gastroenterol* 1982; 17(supl 74):11–20.
152. **Potten CS, Kellett M, Roberts SA, Rew DA, Wilson GD.** Measurement of in vivo proliferation in human colorectal mucosa using bromodeoxy-uridine. *Gut* 1992;33:71–8.
153. **Miyachi K, Fritzler MJ, Tan EM.** Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immunol* 1978;121:2228–34.
154. **Takasaki Y, Dseng JS, Tan EM.** A nuclear antigen associated with cell proliferation and blast formation. Its distribution in synchronised cells. *J Exp Med* 1981;154:1899–909.

155. **Sarraf CE, McCormick CSF, Brown GR, et al.** Proliferating cell nuclear antigen immunolocalization in gastro-intestinal epithelia. *Digestion* 1991;50:85–91.
156. **Polak JM, van Noorden S.** An introduction to immunochemistry: Current techniques and problems. Royal Microscopical Society, Microscopy Handbooks 11. London, Oxford University Press 1988.
157. **Jacobs LR, Polak JM, Bloom SR, Dowling RH.** Intestinal mucosal and fasting plasma levels of immunoreactive enteroglucagon in three animal models of intestinal adaptation: resection, hypothermic hyperphagia and lactation in the rat. En: *Falk Symposium 30. Mechanisms of intestinal adaptation*. Robinson JW, Dowling RH, Riecken EO, eds. Lancaster, MTP Press 1982:231–40.
158. **Bloom SR, Polak JM.** The hormonal pattern of intestinal adaptation. A major role for enteroglucagon. *Scand J Gastroenterol* 1982;17(Supl 74):93–103.
159. **Gregor M, Menge H, Stössel R, Riecken EO.** Effect of monoclonal antibodies to enteroglucagon on ilial adaptation after proximal small bowel resection. *Gut* 1987;28(supl 1):9–14.
160. **Goodlad RA, Rattcliffe B, Lee CY, et al.** Effects of intestinal microflora and dietary fibre on plasma hormones. *Digestion* 1990; 46(supl 1):36–7.
161. **Gregor M, Stallmach A, Menge H, Riecken EO.** The role of gut-glucagon-like immunoreactants in the control of gastrointestinal epithelial cell renewal. *Digestion* 1990;46(supl 2):59–65.
162. **De Miguel E.** Neurotensina y trofismo intestinal. Estudio experimental en distintos tipos de resección. Tesis Doctoral. Madrid, Universidad Complutense, 1991.
163. **Alvarez I.** Estudio de los fenómenos de adaptación en distintos tipos de resección intestinal. Estudio experimental en la rata. Tesis Doctoral. Madrid, Universidad Complutense, 1992.

164. **Bloom SR.** Gut hormones in adaptation. *Gut* 1987;28(supl 1):31–5.
165. **Holst JJ.** Gut glucagon, enteroglucagon, gut glucagonlike immuno-reactivity, glicentin – current status. *Gastroenterol* 1983;84:1602–13
166. **Moody AJ, Thim L.** Glucagon, glicentin and related peptides. En: Lefèbvre PJ, ed. *Glucagon (Handbook of experimental pharmacology; v. 66/l)*. Berlin, Springer-Verlag, 1983;139–54.
167. **Ensinck JW, D'Alessio DA.** The enteroinsular axis revisited. A novel role for an incretin. *N Eng J Med* 1992;326:1352–3.
168. **Goodlad RA, Gathe MA, Bloom SR, Wright NA.** Glucagon 1–21 reduces intestinal epithelial cell proliferation in parenterally fed rats. *Experimental physiology* 1991;76:943–9.
169. **Valverde I.** Heterogeneity of circulating glucagon and glucagon-like immunoreactivity. En: Lefèbvre PJ, ed. *Glucagon (Handbook of experimental pharmacology; v. 66/l)*. Berlin, Springer-Verlag, 1983:223–44.
170. **Gutniak M, Ørskov C, Holst JJ, Ahrén B, Efendic S.** Antidiabetogenic effect of glucagon-like peptide-I (7–36)amide in normal subjects and patients with diabetes mellitus. *N Eng J Med* 1992;326:1316–22.
171. **Valverde I, Rovira A, Calvo G.** Plasma glucagon and glucagon-like immunoreactive components. En: Mngola EN, ed. *Diabetes 1982. Proceedings of the 11th Congress of the International Diabetes Federation; 1982 Nov 10–17; Nairobi*. Amsterdam, International Congress Series No. 600, 1982:371–5.
172. **Carraway R, Leeman SE.** Radioimmunoassay for neurotensin, a hypothalamic peptide. *J Biol Chem* 1976;251:7035–44.

173. **Pek SB, Spangler RS.** Hormones in the control of glucagon secretion. En: Lefèbvre PJ, ed. Glucagon (Handbook of experimental pharmacology; v. 66/II). Berlin, Springer-Verlag, 1983;99–114.
174. **Nustede R, Köhler H, Peiper M, Felmelden D, Fölsch UR, Schafmayer A.** Contribution of neurotensin to the entero–pancreatic axis. Digestion 1990;46(supl 2):188–94.
175. **Barber DL, Cacace AM, Raucci DT, Ganz MB.** Fatty acids stereo–specifically stimulate neurotensin release and increase $[Ca^{2+}]$ in enteric endocrine cells. Am J Physiol 1991;261:G497–503.
176. **Hughes CA, Ducker DA.** Adaptation of the small intestine–Does it occur in man? Scand J Gastroenterol 1982;17(supl 74):149–58.